

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

E.A.P. DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

**Identificación molecular de levaduras nativas y
evaluación de su capacidad biosorbente de cobre**

TESIS

**Para optar al Título Profesional de Bióloga Microbióloga
Parasitóloga**

AUTORA

Marisela Torres Rodríguez

ASESOR

Pablo Ramírez Roca

Lima – Perú

2016

DEDICATORIA

A mi madre, por todo lo que me ha dado.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Pablo Ramírez, Jefe del Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, mi asesor, quien confió en mí, me apoyó, fue paciente y me brindó las facilidades para el desarrollo de la tesis.

Al equipo del Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, las profesoras Mg. Ruth García y Débora Alvarado.

A los chicos de laboratorio, en especial a Jordan Bernaldo y Linda Díaz por su apoyo en el desarrollo de la tesis y a Fernando de La Cruz por su apoyo en la parte molecular.

Al Laboratorio Alex Stewart Assayers del Perú por su apoyo en los análisis de absorción atómica.

ÍNDICE GENERAL

	Pág
1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUCCIÓN	3
4. MARCO TEÓRICO	6
5. OBJETIVOS	20
6. MATERIAL Y MÉTODOS	20
6.1. Materiales	20
6.1.1 Material biológico	20
6.1.2 DNA y enzimas	20
6.1.3. Medios de cultivo y reactivos	21
6.1.4. Material de laboratorio	21
6.1.5. Equipos	21
6.2. Métodos	22
6.2.1 Selección de levaduras nativas con capacidad de resistencia	22
6.2.2 Obtención de biomasa	22
6.2.3 Evaluación de la capacidad de biosorción	22
6.2.4 Identificación molecular de levaduras	23
a. Extracción de ADN genómico	23
b. Iniciadores y condiciones de PCR	24
c. Electroforesis de DNA en geles de agarosa	24
d. Secuenciación de los productos de PCR	24

	Pág
e. Análisis bioinformático	25
f. Construcción del árbol filogenético	25
6.2.5 Efecto del Cu(II) sobre las cepas	25
7. RESULTADOS	27
7.1 Evaluación de la resistencia	27
7.2 Efecto del Cu(II) sobre las cepas	29
7.3 Evaluación de la capacidad de biosorción de la cepa 9TS-500-1L	35
7.4 Identificación molecular	48
7.5 Filogenia molecular	52
8. DISCUSIÓN	54
8.1 Evaluación de la resistencia	54
8.2 Evaluación de la capacidad de biosorción de la cepa 9TS-500-1L	55
8.3 Efecto del Cu(II) sobre las cepas	57
8.4 Identificación molecular	57
9. CONCLUSIONES	59
10. RECOMENDACIONES	60
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
12. ANEXO	74

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág
Tabla 1. Microorganismos más utilizados en sistemas de biorremediación de suelos y aguas.	18
Tabla 2. Biosorción de metales pesados por diferentes biomasas fúngicas.	19
Tabla 3. Concentración mínima Inhibitoria de 13 cepas de levaduras frente a Cu (II)	28
Tabla 4. Porcentaje de biosorción de Cu (II) por biomasa viva de la cepa 9TS-500-1L	37
Tabla 5. Porcentaje de biosorción de Cu (II) por biomasa muerta de la cepa 9TS-500-1L	39
Tabla 6. Z score de los valores de la cantidad de cobre del ensayo con biomasa viva	42
Tabla 7. Z score de los valores de la cantidad de cobre del ensayo con biomasa muerta.	42
Tabla 8. Resumen de los porcentajes de Biosorción con biomasa viva y muerta según los tiempos.	43

ÍNDICE DE FIGURAS

		Pág
Figura 1	Caldo de Hiroyasu sin Cu (II) (izquierda), control con Cu (II) sin inóculo (centro) y con Cu (II) más inóculo (derecha).	23
Figura 2	Cepa 8TS-500-2 en agar YPG con 1mM de Cu (II) (izquierda) y con 10 mM de Cu (II) (derecha).	30
Figura 3	Coloración Gram de la cepa 3JS-500-3LK de la placa con YPG con 5 mM de Cu (II) (izquierda) y con 10 mM de Cu (II) (derecha) (1000X).	30
Figura 4	Coloración Gram de las cepa 3JS-500-3LK a partir de agar YPG conteniendo 15mM de Cu (II) (A) y 10 mM de Cu (II) (B y C) (1000X). En los tres casos se observa el alargamiento de las células.	31
Figura 5	Microscopía electrónica de la cepa 3JS-500-3LK en medio YPG con 1 mM (4000x).	32
Figura 6	Microscopía electrónica de la cepa 3JS-500-3LK en medio YPG con 10 mM (20000x).	33
Figura 7	(A) Microscopía electrónica de la cepa 3JS-500-3LK a 1360x. (B) Microscopía electrónica de la cepa 3JS-500-3LK a 1000x. Ambos a 20mM de Cu (II). Se observa la formación de pseudohifas (flechas amarillas)	33
Figura 8	Filtración de las alícuotas.	36
Figura 9	Sobrenadante de cinética de biosorción con biomasa viva filtrado. 48 horas (T9), 36 horas (T8), 24 horas (T7) y 3 horas (T6).	36
Figura 10	Sobrenadante de cinética de biosorción con biomasa muerta filtrado. 3 horas (T5), 60 min (T4), 30 min (T3) y 15 min (T2).	36

	Pág
Figura 11 Cantidad de Cobre (II) en el sobrenadante de la cinética con biomasa viva de la cepa 9TS-500-1L a través del tiempo.	38
Figura 12 Porcentaje biosorción de Cu (II) en el sobrenadante por la biomasa viva de la cepa 9TS-500-1L a través del tiempo.	38
Figura 13 Cantidad de Cu (II) en el sobrenadante de la cinética con biomasa muerta de la cepa 9TS-500-1L a través del tiempo.	40
Figura 14 Comparación del porcentaje de biosorción de Cu (II) en los ensayos con biomasa viva y muerta de la cepa 9TS-500-1L.	41
Figura 15 Comparación de la cantidad de Cu (II) en los ensayos con biomasa viva y muerta de la cepa 9TS-500-1L y control.	41
Figura 16 Gráficas de la distribución de los datos del % de biosorción de Cu con biomasa viva (arriba) y biomasa muerta (abajo).	44
Figura 17 Prueba T student de dos muestras (% biosorción con biomasa viva y con biomasa muerta) obtenida del programa Minitab versión 17.	45
Figura 18 Prueba de análisis de varianzas para dos muestras (% de biosorción con biomasa viva y muerta) obtenida del programa Minitab versión 17.	46
Figura 19 Electroforesis en gel de agarosa de los amplificados de las cepas1: 3TA-500-1K (600pb), 2: 3JS-500-3LK (600pb), 3: Ladder 50 – 2 000 pb DNA “Ladder” (Novagen®)	49
Figura 20 Secuencia Forward (izquierda) y Reverse (derecha) de la cepa 3JS 500 3LK en el programa Bioedit.	50
Figura 21 Secuencia consenso de la región D1/D2 del rRNA 28s de la cepa 3JS 500 3LK en el programa Bioedit.	51

	Pág
Figura 22 Árbol filogenético construido en el programa MEGA versión 6, con las secuencias de la base de datos del Gene Bank y con las secuencias estudiadas.	52
Figura 23 Secuencias alineadas en el programa MEGA versión 6 para la construcción del árbol filogenético.	53
Figura 24 BLASTn de la cepa 3JS 500 3LK.	74
Figura 25 BLASTn de la cepa 3TA 500 1K.	74

1. RESUMEN

Actualmente, uno de los problemas en el mundo es la descarga de metales pesados hacia el medio ambiente y dentro de éstos encontramos al cobre. Los tratamientos fisicoquímicos empleados para remediar este problema no lo solucionan por completo, mientras que la biorremediación presenta ventajas como bajos costos de instalación y operación, tecnología de fácil aplicación, los productos formados son generalmente inocuos, tratamiento seguro con un mínimo riesgo a la salud y es tecnológicamente efectiva. En el presente trabajo se estudiaron levaduras aisladas de zonas mineras de Junín y Tumbes para determinar su resistencia al cobre, su capacidad de biosorción de dicho metal y posteriormente su identificación molecular.

Primero se evaluó su capacidad de resistencia y se seleccionó la mejor cepa para realizar un ensayo de cinética de biosorción y posteriormente identificarla molecularmente. De un total de 13 cepas de levaduras, 4 de ellas presentaron MICs de hasta 20 mM de concentración de cobre, 6 presentaron MICs de 30 mM, 1 tuvo un MIC de 40 mM y otra, un MIC de 60 mM; mientras que una cepa solo alcanzó a tolerar 10 mM de cobre. La cepa más resistente según la identificación molecular resultó ser *Yarrowia lipolytica*.

De acuerdo a los resultados se concluye que las cepas en general presentaron capacidad de resistencia, en especial 9TS 500 1L (*Yarrowia lipolytica*) que, sin embargo, tuvo poca capacidad de biosorción (1.29% con biomasa viva y 0.72% con biomasa muerta en una hora).

Palabras clave: Cobre, levadura, resistencia, biosorción, identificación molecular.

2. ABSTRACT

Nowadays, one of the problems in the world is the heavy metal discharge into the environment. Among these we can find copper and the physicochemical treatments used to remediate this problem do not solve it completely, meanwhile bioremediation has advantages such as low installation and operation cost, easy application technology, the resulting products are generally harmless, safe treatment with minimal health risk and it is technologically effective. In this research, we isolated yeasts from Junín and Tumbes mining were evaluated to determinate its Copper resistance and biosorption capacity and then the strains were molecularly identified.

At first, the resistance capacity was evaluated and the best strain was selected to perform the biosorption kinetics assay and later it was molecularly identified. From 13 yeasts strains, 4 of them had MIC until 20 mM copper concentration, 6 had 30 mM MIC, 1 had 40 mM MIC and another one had 60 mM MIC; but one had only 10 mM MIC. The most resistant strain according to molecular identification was *Yarrowia lipolytica*.

Based on the results it is concluded that strain, in general, presented resistance capacity, especially 9TS 500 1L (*Yarrowia lipolytica*) but, however, it had little biosorption capacity (1.29% using living biomass and 0.72% using dead cells in one hour).

Key words: Copper, yeast, resistance, biosorption, molecular identification.

3. INTRODUCCIÓN

Un problema creciente en el mundo es el aumento de las descargas conteniendo metales pesados hacia el ambiente, que además sigue en aumento debido al incremento demográfico e industrial (Navarro, 2006). En nuestro país la minería es una actividad de gran importancia que nos permite ocupar los primeros puestos en la producción minera; sin embargo, los diversos procesos para la extracción producen relaves que contaminan nuestro medio. La población de las regiones afectadas está expuesta permanentemente a los pasivos mineros, lo cual perjudica ecosistemas terrestres y acuáticos y sobre todo al hombre, pues al encontrarse en la cúspide de la pirámide alimenticia, recibe los metales en forma preconcentrada (Garza, 2005) causando envenenamiento, desordenes en las funciones celulares y hasta la muerte. Afortunadamente, a fines del siglo XX, el surgimiento explosivo de los temas de responsabilidad medioambiental, en una primera etapa, y de sustentabilidad y responsabilidad social corporativa, en la siguiente, pusieron término irreversible a esa situación.

Ante dicha situación felizmente existen diferentes procesos que ayudan a la recuperación de estos ambientes; uno de estos métodos es la biosorción; un proceso fisicoquímico y bioquímico que incluye los fenómenos de adsorción y absorción de moléculas e iones por diferentes materiales de origen biológico; básicamente, retener metales (Muñoz, 2007) y se presenta como una tecnología alternativa en el tratamiento de aguas residuales ya que presenta un bajo costo de proceso y una buena capacidad de sorción (Kotrba et al, 2011). Los métodos químicos resultan costosos debido a que el agente activo no puede ser recuperado para su posterior reutilización. Además, el producto final es un lodo con alta concentración de metales lo que dificulta su eliminación (Cañizares, 2000). El desarrollo de esta tecnología empezó en la década de los 90. Las primeras publicaciones

describían la cantidad de materiales biológicos que podían emplearse para eliminar, a muy bajo coste, incluso a concentraciones bajas, metales tóxicos de efluentes industriales.

El uso de tecnologías de biorremediación presenta varias ventajas respecto a otras técnicas alternativas para eliminar los compuestos contaminantes como son los tratamientos físico-químicos tradicionales. Algunas de estas ventajas son: bajos costos de instalación y operación, tecnología de fácil aplicación, los productos formados son generalmente inocuos, tratamiento seguro con un mínimo riesgo a la salud y es tecnológicamente efectiva. Los microorganismos y sus productos pueden ser bioacumuladores muy eficientes de metales solubles y particulados, especialmente a partir de concentraciones externas diluidas, por esto las tecnologías basadas en los microorganismos ofrecen una alternativa o ayudan a las técnicas convencionales para la eliminación/recuperación de metales (Cañizares, 2000).

En este tipo de tecnologías las bacterias son las más empleadas, aunque también se han empleado otros microorganismos como hongos, algas, cianobacterias y actinomicetos (Atlas & Bartha, 2002; Benavides et al., 2006). Sin embargo los hongos que incluyen a las levaduras, han recibido especial atención con relación a la biosorción de metales pues tienen muchas ventajas que facilitan su uso en procesos de biorremediación, pues están presentes en sedimentos acuáticos y en hábitats terrestres y pueden producir enzimas extracelulares que degradan los contaminantes (Deley, 2010). Además las células fúngicas interaccionan con metales a diferentes niveles, desde la pared celular, el periplasma y la membrana plasmática, hasta el citoplasma y los organelos celulares (Gutiérrez et al., 2010).

Los hongos son más adecuados para estos propósitos que otros grupos de microorganismos debido a su gran tolerancia hacia metales y otras condiciones adversas

como bajo pH, la alta capacidad de unión de su pared y sus altos valores de incorporación de metal a su interior (Gadd, 1987).

Por otro lado, existen ventajas tanto para el uso de biomasa viva como inerte; por ejemplo, el uso de células vivas de levaduras presenta una serie de ventajas, como por ejemplo; a) el sistema se autorrestablece debido al crecimiento, b) los metales se depositan en un estado químico alterado y por ello menos sensible a la desorción espontánea, c) se pueden utilizar sistemas multienzimáticos, d) se pueden mejorar las cepas por medio del aislamiento de mutantes o la manipulación genética, debido a que ésta es una propiedad microbiana que puede aprovecharse e) se pueden emplear dos o más organismos de una manera sinérgica. En cuanto a la biomasa inerte, es independiente del crecimiento, no necesita nutrientes y no está sujeta a las limitaciones de toxicidad (Cañizares, 2000).

Aún existe una gran necesidad de continuar los estudios de la aplicación de diversos microorganismos; por ello las investigaciones empleando células de levaduras con capacidad biosorbente de metales pesados son necesarios debido a la escasa información que existe, considerando además que se presentan como una alternativa de descontaminación viable y económica para el país. En este sentido, la presente investigación estuvo orientada a evaluar la capacidad biosorbente de Cu (II) de levaduras aislados de suelos y agua contaminados de Tumbes y Junín.

4. MARCO TEÓRICO

4.1. METALES PESADOS

Los metales se encuentran en estado elemental o unidos formando complejos pero bajo ninguna de estas formas, pueden mineralizarse (Atkinson, 1998). El rasgo distintivo de los metales pesados, es que aún cuando muchos de ellos son esenciales para el crecimiento como el Mg, Ca, V, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn y Mo; se ha reportado que también tienen efectos tóxicos sobre las células principalmente como resultado de su capacidad para alterar o desnaturalizar las proteínas (Cañizares, 2000). El cobre es uno de los metales más tóxicos para organismos acuáticos y ecosistemas. El más biodisponible y por ello la forma más tóxica de Cobre es el ion cúprico Cu (II) (Wright & Welbourn, 2002). Entre los mecanismos moleculares que determinan la toxicidad de los metales pesados se encuentran:

- 1.- El desplazamiento de iones metálicos esenciales de biomoléculas y bloqueo de sus grupos funcionales.
- 2.- Codificación de la conformación activa de biomoléculas, especialmente enzimas y polinucleótidos.
- 3.- Ruptura de la integridad de biomoléculas.
- 4.- Modificación de otros agentes biológicamente activos (Cañizares, 2000).

En humanos solo se requiere cantidades de 5 a 20 microgramos de Cu (Kirova et al., 2012). La acumulación de cobre puede generar radicales hidroxilos lo cual causa daño celular como oxidación de proteínas, clivaje del DNA y RNA y destrucción de la membrana por peroxidación de lípidos. Los compuestos de cobre se encuentran en el agua y en el suelo, siendo los más peligrosos para los seres humanos los solubles o los usados en la agricultura como abonos y pesticidas, como por ejemplo la cal cúprica y los quelatos de

cobre. La causa de muerte por cobre se produce cuando la cantidad de éste supera los 250 mg/día (Zambrano, 2011).

Entre algunos otros de los perjuicios para la salud a causa de cobre se conocen los problemas de crecimiento y baja esperanza de vida. Además la presencia de altas concentraciones de cobre en los órganos humanos, tales como cerebro, piel, hígado, riñones y miocardio producen el llamado mal de Wilson (Jo et al., 2008) y la ingestión excesiva en forma aguda provoca hemólisis y hemorragias gastrointestinales (Rodríguez, 2001).

De igual forma, fragmentos de cobre o de sus aleaciones pueden producir chalcosis o uveítis. La chalcosis consiste en la acumulación de cobre en los tejidos de los ojos que puede causar la pérdida de la visión; mientras que la uveítis es la hinchazón e irritación de la úvea, la capa media del ojo que suministra la mayor parte del flujo sanguíneo a la retina. Por otro lado, períodos cortos de inhalación de vapores de cobre producen envenenamiento que se manifiesta de manera inmediata con fiebre, escalofríos, dolores musculares y vómito. Si la exposición es por periodos largos puede producir anorexia, hepatomegalia y decoloración de la piel y pelo (Programa Ambiental Regional para Centroamérica, 2004; Lenntech, 2009).

El cobre es un elemento traza que es esencial para la salud de los seres humanos, además de ser un micronutriente esencial de la mayoría de los organismos. Se trata de un metal de color rojizo que junto con el oro y la plata forman la familia del cobre. Posee propiedades mecánicas tanto puro como en aleaciones por lo que presenta gran variedad de aplicaciones. Es dúctil y gran conductor de electricidad, además es duradero y reciclable sin perder sus propiedades mecánicas. El cobre no metálico, sulfato de cobre II es el

compuesto de mayor importancia industrial y se emplea como pesticida y abono. El cobre metálico o sus aleaciones se utilizan principalmente en la fabricación de cables eléctricos (Martín, 2008).

Además posee un rol biológico importante en la fotosíntesis de las plantas aunque no forma compuesto con la clorofila (Peterson, 1995; Linder, 1998; WHO 1998). Sus fuentes naturales son la malaquita ($\text{CuCO}_3 \cdot \text{Cu}(\text{OH})_2$), la cuprita CuO_2 y la calcopirita CuFeS_2 (Tenorio, 2006).

4.2 MÉTODOS FISICOQUÍMICOS DE REMOCIÓN DE METALES PESADOS EN SOLUCIÓN

4.2.1 Precipitación química. Este proceso permite extraer y concentrar compuestos inorgánicos de corrientes líquidas que tienen bajas concentraciones de contaminantes. Consiste en hacer reaccionar un reactivo químico (sea hidróxido o sulfuros) con iones de metales pesados con la finalidad de generar precipitados insolubles, de manera que se modifica el pH y así se logra precipitar, luego pueden sedimentarse y separarse. Entre los compuestos más usados se tienen el hidróxido de sodio, hidróxido de magnesio, carbonato de sodio, sulfato sódico, fosfato trisódico, sulfato ferroso, entre otros. El proceso requiere además de un floculante y toma entre 90 a 150 minutos (Castells, 2000; Fu & Wang, 2011).

Las ventajas de este método son: permitir la separación de metales en concentraciones muy bajas, su fácil operación y tiene bajos costos pero presenta también desventajas pues produce un volumen de fangos más elevado que en los procesos biológicos además de la precipitación de algunos metales pesados que podrían estar disueltos, lo que genera

problemas en la estabilización de los fangos en procesos de digestión anaerobia (Sans & Ribas, 1989; Castells, 2000; Fu & Wang, 2011).

4.2.2 Precipitación con hidróxidos. Esta técnica es muy usada por ser un método simple, en donde se puede utilizar una amplia gama de hidróxidos, es de bajo costo, se puede controlar el pH, y los hidróxidos de los metales pueden ser removidos por floculación y sedimentación. En este proceso es fundamental el control del pH ya que durante la adición de los hidróxidos, un pH puede ser ideal para precipitar un metal pero también puede solubilizar a otro (Castells, 2000; Fu & Wang, 2011).

4.2.3 Precipitación con sulfuros. Este método tiene ventajas respecto al método de hidróxidos, ya que la solubilidad de los sulfuros metálicos precipitados es mucho menor que la de los productos precipitados con hidróxidos, y al no ser anfóteros (elementos que pueden reaccionar tanto como cationes o aniones) se puede lograr una mayor remoción de metales en un rango de pH mucho más amplio que con los hidróxidos. Sin embargo, en soluciones ácidas pueden dar lugar a la formación de H_2S que es tóxico, por ello el proceso debe realizarse en un medio entre neutro o básico. Otro problema que genera este procedimiento es la formación de precipitados coloidales lo que dificulta la separación en los procesos de sedimentación o filtración (Fu & Wang, 2011).

4.2.4 Intercambio iónico. Para este proceso se utilizan tanto resinas naturales como artificiales que hacen de este un método altamente eficiente en la remoción, tiene gran capacidad de tratamiento y cinética rápida. Consiste en hacer pasar el agua que contiene los metales pesados a través de una columna de resina de intercambio catiónico, de manera que los iones metálicos son intercambiados por iones hidrogeno o iones sodio de la resina.

Las variables a controlar en este proceso son el pH, la temperatura, la concentración inicial de metales y tiempo de contacto (Fu & Wang, 2011).

4.2.5 Adsorción. Por este método, los iones o moléculas son retenidas sobre la superficie de un sólido denominado adsorbente. Es un método eficaz y económico, tiene como ventaja proporcionar flexibilidad en el diseño y la operación lo que permite obtener en muchos casos un efluente de alta calidad. Ya que es un proceso reversible, la desorción permite regenerar los adsorbentes (Fu & Wang, 2011).

Uno de los adsorbentes más usados es el carbón activado que tiene capacidad de intercambio catiónico y gran cantidad de poros lo que proporciona una gran área superficial. Además, puede ser regenerado a altas temperaturas, entre 873 K y 1173 K, y vapor de agua o CO₂. La desventaja del carbón activado es su alto costo. Su mayor utilidad es para la refinación de aguas provenientes de tratamientos químicos o biológicos (Sans & Rivas, 1989; Fu & Wang, 2011).

4.2.6 Filtración por membrana. Es un método de alta eficiencia, fácil operación y ahorro de espacio. Para ello se utiliza la ultrafiltración, ósmosis inversa, nanofiltración y la electrodialisis. La efectividad de estos procesos depende de los factores de trabajo de la membrana, las concentraciones de los metales y surfactantes, pH de la solución, la fuerza iónica y que los metales se encuentren precipitados. Así por ejemplo, la ultrafiltración es usada para el tratamiento y reutilización de aguas residuales a nivel industrial sea que estas hayan sido tratadas o no previamente y también para aguas residuales urbanas que hayan sido tratadas previamente. El proceso consiste en hacer circular a presión por una membrana con diámetro tal que solo permita el paso del agua y no de otras moléculas. Los poros pueden ser entre 0.001 a 0.02 micras, de esta manera se retiene la materia coloidal,

grandes moléculas orgánicas y microorganismos que no pueden ser separados por intercambio iónico. Las membranas pueden ser de acetato de celulosa, policloruro de vinilo PVC, policarbonato, polisulfona, entre otros (Sans & Rivas, 1989; Rigola, 1990; Fu & Wang, 2011).

4.2.7 Coagulación y floculación. Los coloides al poseer cargas superficiales electrostáticas, presentan fuerzas de repulsión entre ellas, lo que evita aglomerarse y por ende dificulta la sedimentación. La coagulación es un método que permite la neutralización de estas cargas superficiales mediante el uso de electrolitos de carga opuesta, lo que aumenta el número de cargas (Rigola, 1990).

Para la floculación se utilizan polímeros orgánicos de gran peso molecular como son las poliacrilamidas, con la finalidad de incrementar la masa de los flóculos para de esta manera lograr fácilmente la decantación o sedimentación (Marín, 2003).

Los procesos de coagulación-floculación tienen por objeto retirar los coloides del agua que no se pueden eliminar por decantación simple. Son métodos usados comúnmente para tratar aguas residuales y actualmente se investiga su utilidad en la remoción de metales pesados. Para ello se ha trabajado con coagulante polielectrolito anfótero tiene varias limitaciones entre ellas el control del pH de la solución a tratar, por ello se considera que no son eficientes por si solos para remover metales pesados en solución. La coagulación y floculación pueden utilizarse como método de apoyo a una precipitación previa, ya que no sirven para la eliminación de metales iónicos disueltos (Marín, 2003; Fu & Wang, 2011).

4.2.8 Flotación. La flotación se ha empleado para separar metales pesados de una fase líquida utilizando la adhesión a burbujas, originados en el procesamiento de minerales.

Los principales procesos de flotación para la eliminación de iones metálicos en solución son: flotación por aire disuelto, flotación de iones y flotación precipitada. Este proceso posee limitaciones debido al pH, entre más básica sea la solución tratada mejor será la eficiencia (Fu & Wang, 2011).

Durante la flotación se separan las partículas hidrofóbicas de las hidrofílicas, así las partículas hidrofóbicas, débilmente humectadas, se adhieren a las burbujas de aire, de manera que esta tiene menor peso específico que el medio y de esta manera emerge en la superficie. Por otro lado las partículas hidrofílicas no se adhieren a las burbujas de aire por lo que se hunden (Laskowaki, 1973).

4.3 BIORREMEDIACIÓN

El termino Biorremediación fue acuñado por los científicos a inicios de 1980 para describir el uso de microorganismos para limpiar aguas y suelos contaminados. El prefijo “bio” está asociado al proceso biológico que se lleva a cabo por organismos vivos y “remediación” hace referencia al proceso que resulta en la limpieza, o remediación, del ambiente vía degradación completa, secuestro o remoción de los contaminantes como resultado de la actividad microbiana (Malik, 2006).

4.3.1 Principales procesos de biorremediación

- a. Biorremediación intrínseca.** Es un proceso mediante el cual la microflora y las condiciones ambientales existen para la atenuación de un contaminante a niveles seguros dentro de un rango de tiempo aceptable. Aquí los procesos naturales de la subsuperficie tales como dilución, volatilización, biodegradación, adsorción y

reacciones químicas con materiales de la subsuperficie pueden reducir las concentraciones de contaminante hasta niveles aceptables. Esto no necesita intervención solo monitoreo del proceso natural de biodegradación (Malik, 2006).

- b. Bioestimulación.** Involucra la adición de nutrientes específicos al lugar (agua/suelo) para estimular la actividad de microorganismos indígenas. Los fertilizantes y suplementos de crecimiento son estimulantes comunes. La presencia de una pequeña cantidad de contaminantes también puede actuar como estimulante pues activa los operones que codifican enzimas de la biorremediación. La bioestimulación puede llevarse a cabo *in situ* o *ex situ* (Malik, 2006).
- c. Bioventing.** Similar a la bioestimulación pero involucra la ventilación de oxígeno a través del suelo para estimular el crecimiento de microorganismos introducidos o autóctonos. Por lo tanto el bioventing puede complementar la bioestimulación y la bioaumentación. Es una tecnología que estimula la degradación *in situ* de compuestos degradables aerobicamente. Generalmente usa velocidades bajas de flujo de aire para proporcionar solo el oxígeno suficiente para mantener la vida microbiana (Malik, 2006).
- d. Bioaumentación.** La adición de microorganismos degradadores del contaminante (naturales/exóticos/aclimatizados/genéticamente modificados) para aumentar la capacidad biodegradativa de las poblaciones microbianas indígenas es denominado bioaumentación. Algunas veces los microorganismos del sitio de remediación son colectados, cultivados aparte y regresados al lugar como un medio de incrementar rápidamente la población microbiana del lugar (Malik, 2006).

e. Biosorción. Es un proceso que utiliza biomasa viva o muerta, para retirar o inmovilizar estos iones metálicos a través de mecanismos fisicoquímicos como la adsorción o el intercambio iónico. El proceso de biosorción involucra una fase sólida (sorbente) y una fase líquida (solvente, que es normalmente el agua) que contiene las especies disueltas que van a ser sorbidas (sorbato, e. g. iones metálicos). Debido a la gran afinidad del sorbente por las especies del sorbato, este último es atraído hacia el sólido y enlazado por diferentes mecanismos. Este proceso continúa hasta que se establece un equilibrio entre el sorbato disuelto y el sorbato enlazado al sólido (a una concentración final o en el equilibrio) y se ha estudiado en detalle desde los años 70 (Cañizares, 2000; Mejía, 2006). La mayor ventaja de la tecnología de biosorción de metales pesados es su efectividad en reducir la concentración de iones a niveles muy bajos y el uso de materiales biosorbentes económicos (Volesky, 2007; Gadd, 2009; Wang & Chen; 2009; Ramesh et al., 2011; Zhang et al., 2011), además presenta bajos costos de capital y energía; además debido a su gran flexibilidad puede usarse in situ y no causa contaminación ambiental (Zambrano, 2011).

La capacidad de unión de las biomasas se debe a la potencial cantidad de compuestos orgánicos como polialginatos, peptidoglucanos, polisacáridos, flavonoides, entre otros, los cuales son capaces de adsorber y/o intercambiar iones metálicos debido a sus grupos funcionales (aminos, hidroxilos, carboxílicos, fosfatos, etc.) que actúan como centros atrayentes de cationes.

La pared celular realiza la retención del metal mediante una interacción fisicoquímica del metal con grupos amino e hidroxilo propios de la quitina presentes en la pared, al igual que grupos fosfato, sulfihidrilo y carboxilo. Esta interacción se traduce en la formación de un enlace covalente coordinado pues el ion metálico

actúa como un átomo central que dispone de orbitales vacíos capaces de aceptar pares de electrones. Estos pares de electrones son precisamente donados por los grupos funcionales nombrados (Navarro et al., 2006 (A)).

Para la fijación de metales pesados en la biosorción se han sugerido una serie de mecanismos que explican la retención o secuestro del metal en diferentes partes del biosorbente:

- a) Adsorción física: comprende los fenómenos asociados a fuerzas de Van der Waals. Este proceso es rápido y reversible.
- b) Intercambio iónico: los iones metálicos presentes en los polisacáridos de las biomasas (i.e., calcio, magnesio, potasio, etc.) son intercambiados por los iones metálicos presentes en la solución acuosa (i.e., cobre, plomo, etc.). El proceso es rápido y reversible.
- c) Complejación o quelación: el metal se une a los centros activos de la pared celular mediante enlaces químicos formando determinados complejos.
- d) Precipitación: se asocia a la formación de un complejo en la pared celular que posteriormente es hidrolizado.

Generalmente se considera que en la biosorción de metales pesados pueden aparecer simultáneamente más de uno de los mecanismos anteriormente señalados, siendo, en algunos casos, difícil explicar el mecanismo de adsorción que tiene lugar en un proceso de biosorción determinado. El intercambio iónico es un mecanismo de biosorción que ha sido planteado por diversos investigadores como el proceso principal por el cual se adsorben los metales pesados en ciertos biosorbentes (Dávila, 2012).

Cuando se utiliza biomasa viva, los mecanismos metabólicos de captación también pueden contribuir en el proceso, lo cual depende del ciclo metabólico celular, los iones metálicos son y transportados al interior celular a través de la pared celular. El modo activo puede contribuir significativamente en la remoción para levaduras. La internalización del metal de modo activo ha sido observada para metales como cobre, cadmio, níquel, zinc, cobalto manganeso y calcio. La investigación ha indicado que a alta concentración de metal, el modo activo no contribuye significativamente a la toma del metal, especialmente para hongos filamentosos. El mecanismo de internalización activa es complejo y no está completamente entendido (Kotrba et al, 2011).

4.4 ANTECEDENTES

Los microorganismos han sido empleados para remover trazas de metales pesados de grandes volúmenes de aguas de relaves mineros y aguas residuales (Antibi & Fishlock, 1980). Los procesos microbianos tienen potencial para usarse en recuperación de metales preciosos o en tratamiento de flujo de residuos (Huang et al, 1990). Muchos materiales biológicos pueden unirse a metales pesados, pero solo aquellos con suficiente alta capacidad de unión y selectividad para metales pesados son apropiados para uso en procesos de biosorción a gran escala (Gadd, 2009; Wang and Chen; 2009; Gomes et al., 2011).

Se ha logrado un amplio conocimiento acerca de los mecanismos físico – químicos del proceso, al punto de dirigir las investigaciones hacia la transformación genética de microorganismos para la optimización del proceso de biosorción (Mejía, 2006). La biosorción no solo ofrece una alternativa innovadora frente a otros enfoques de remediación, sino que también permite la recuperación de metales (Hlihor et al, 2013)

Durante el uso de estas tecnologías se han utilizado diferentes biomasas celulares para tratar de eliminar metales pesados de soluciones acuosas como las levaduras *Hansenula anomala* (Breierova et al., 2009), *Cryptococcus neoformans* (Carro, 2002), entre otros microorganismos que se mencionan en la Tabla 1.

Tanto los mohos como las levaduras presentan una alta eficiencia en la remoción de metales en soluciones acuosas, ya que algunos grupos funcionales de sus células actúan como sitios activos para captar iones metálicos; además la pared celular es el principal sitio de acumulación. Varias referencias han probado que *S. cerevisiae* puede remover metales tóxicos (Huangi et al, 1990; Machado et al, 2010(a); Machado et al, 2010(b); Zhang et al, 2011; Hlihor et al, 2013); además presenta alta eficiencia de bioadsorción de Pb^{2+} , Cd^{2+} y Cr^{3+} (Rodríguez et al 2008) y es capaz de recuperar metales preciosos y detoxificar sistemas contaminados con hidrocarburos (Cuevas, 2008). Se ha reportado la recuperación de aluminio empleando como biosorbente a *S. cerevisiae*, asimismo se ha demostrado que bajo tratamiento alcalino es capaz de eliminar un gran rango de metales pesados como Fe^{+3} , Cu^{+2} , Cr^{+3} , Hg^{+2} , Pb^{+2} , Cd^{+2} , Co^{+2} , Ag^{+} , Ni^{+2} y Fe^{+2} (Palacios & Villalobos, 2007; Talos, 2009).

Tabla 1. Microorganismos más utilizados en sistemas de biorremediación de suelos y aguas

GRUPO	GÉNERO	REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA
Bacterias	<i>Alcaligenes sp.</i>	Leahy y Colwell., 1990; Schlegel, 1997
	<i>Arthrobacter sp.</i>	Leahy y Colwell., 1990; Schlegel, 1997
	<i>Bacillus sp.</i>	Leahy y Colwell., 1990; Olivera y col., 2000; Schlegel, 1997; Nuñez y col., 2004
	<i>Corynebacterium sp.</i>	Leahy y Colwell., 1990; Nuñez, 2003
	<i>Mycobacterium sp.</i>	Leahy y Colwell., 1990; Castillo y col, 2005
	<i>Nocardia sp.</i>	Leahy y Colwell., 1990; Castillo y col, 2005
	<i>Pseudomonas sp.</i>	Leahy y Colwell., 1990; Mueller y col., 1991; Cerniglia, 1992; Stringfellow y Aitken, 1994; Dagher y col., 1997; Schlegel, 1997; Noordman y col., 1998; Castillo y col, 2005
Hongos	<i>Aspergillus sp.</i>	Leahy y Colwell., 1990; Cerniglia, 1992; Fonseca, 1998;
	<i>Penicillium sp.</i>	Leahy y Colwell., 1990; Cerniglia, 1992; Fonseca, 1998;
	<i>Rhizopus sp.</i>	Leahy y Colwell., 1990; Cerniglia, 1992
	<i>Phanerochaete sp.</i>	Zheng y Obbard, 2000; Castillo y col, 2005
	<i>Pleurotus sp.</i>	Bezalel y col, 1998; Eggen, 1999
	<i>Saccharomyces sp.</i>	Leahy y Colwell., 1990
	<i>Candida sp.</i>	Fonseca, 1998; Nuñez, 2003
Algas	<i>Chlorella sp.</i>	Semple y col, 1999
	<i>Dunaliella sp.</i>	Leahy y Colwell., 1990; Cerniglia, 1992
	<i>Chlamydomonas sp.</i>	Semple y col, 1999

Fuente: Abalos & Nápoles, 2011

Entre algunas especies evaluadas en procesos de biorremediación se ha demostrado que *Candida tropicalis* CBL Y capta metales en medio líquido. La concentración mínima inhibitoria de Cd⁺² en *C. tropicalis* CBL Y fue de 2800 ug/mL. La levadura puede también

tolerar Zn^{+2} (3100 ug/mL), Hg^{+2} (2400 ug/mL), Ni^{+2} (3000 ug/mL), Cr^{+6} (2000 ug/mL) y Pb^{+2} (1200 ug/mL) (Rehman et al., 2007).

Otra levadura que ha demostrado capacidad biosorbente es *Pichia stipitis*, que removió Cu^{+2} y Cr^{+3} con una capacidad de consumo máximo específico con biomasa viva de 15.85 y 9.10 mg/g, respectivamente, a una concentración inicial de 100 ppm de Cu^{+2} y Cr^{+3} a pH 4.5 (Yilmazer & Saracoglu, 2009) (Tabla 2).

Estos precedentes alientan la continuación de los estudios de biosorción de metales pesados como alternativa viable de biorremediación, sobretodo usando microorganismos como levaduras que representan una solución más económica y segura a los problemas que provoca la minería en nuestro país.

Tabla 2. Biosorción de metales pesados por diferentes biomosas fúngicas

Hongo	Metal pesado	Capacidad de biosorción	Referencia
<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	Cu^{2+}	93%	Peng et al., (2010)
	Ni^{2+}	89%	Machado et al., (2010)
<i>Trichoderma harzianum</i>	Cu^{2+} Pb^{2+} Zn^{2+}	97%	Akthar et al., (2007)
<i>Aspergillus niger</i>	Ni^{2+}	96%	Amini et al., (2009)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Cu^{2+}	78 mg/g de biomasa	Wang et al., (2010)
<i>Rhizopus arrhizus</i>	Cu^{2+}	79.37 mg/g de biomasa	Aksu y balibek (2007)
<i>Candida lipolytica</i>	Cu^{2+}	60 mg/g de biomasa	Ye et al., (2010)
<i>Mucor rouxii</i>	Cd^{2+}	8.7 mg/g de biomasa	Acosta et al., (2007)
<i>Pichia stipitis</i>	Cu^{2+}	15.85 mg/g de biomasa	Yilmazer & Saracoglu (2009)
	Cr^{3+}	9.10 mg/g de biomasa	

Modificado de: Acosta et al., 2012

5. OBJETIVOS

A. Objetivo general

- Evaluar la capacidad biosorbente de Cu^{2+} de levaduras aisladas de ambientes contaminados de Tumbes y Junín.

B. Objetivos específicos

1. Evaluar *in vitro* la capacidad de resistencia al Cu^{2+} de las levaduras aisladas.
2. Cuantificar los niveles de biosorción de Cu^{2+} .
3. Determinar el efecto del Cu^{2+} sobre la morfología de las levaduras.
4. Seleccionar e identificar las cepas con mayor capacidad biosorbente.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 MATERIALES

6.1.1. Material biológico

13 cepas del Banco de cepas de levaduras del Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología aisladas en el 2008 de ambientes mineros (aguas o suelos según indique la letra A o S del código de la cepa) de las regiones Tumbes y Junín.

6.1.2. DNA y Enzimas

Secuencias de oligonucleótidos iniciadores para amplificar la región D1/D2 del rRNA 28S (Orbegozo et al., 2008) para la realización de la PCR, marcador molecular 50 – 2000 pb DNA “*Ladder*” (Novagen®).

6.1.3. Medios de cultivo y reactivos

- Glicerol
- Peptona
- KCl
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- Kit de coloración Gram
- NaH_2PO_4
- Agar YPG
- Caldo YPG
- CuSO_4
- Agua desionizada
- *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega®)

6.1.4. Material de laboratorio

- Placas petri
- Asas de siembra
- Tubos de ensayo
- Pipetas
- Botellas de vidrio
- Algodón

6.1.5. Equipos

- Termociclador
- Camara de electroforesis
- Transiluminador
- Autoclave

6.2 MÉTODOS

6.2.1. Selección de levaduras nativas con capacidad de resistencia

Para determinar aquellas cepas con mayor capacidad de resistencia al Cu^{2+} se realizó el ensayo de concentración mínima inhibitoria (MIC) en medio YPG (glucosa 20g/L, extracto de levadura 10g/L, peptona 20g/L, agar 15g/L) con sulfato de cobre iniciando con una concentración de 1 mM. Se realizaron las lecturas cada 48 horas y las cepas que mostraron crecimiento fueron evaluadas a una concentración superior (Lavalle et al., 2007). El ensayo de MIC se ejecutó tanto en medio sólido como en medio líquido para evaluar la resistencia de las cepas en ambos casos.

6.2.2. Obtención de la biomasa

Para obtener biomasa para la cinética de biosorción se sembró la cepa elegida en agar YPG, se incubó durante 48 horas y se cosechó de la siguiente manera: Para el ensayo con biomasa viva, las células fueron centrifugadas y lavadas 2 veces con solución salina. Para el ensayo con biomasa muerta, se enjuagaron las células 2 veces y una vez más con una solución 1 M de NaOH, se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 minutos. Posteriormente se centrifugó a 4 000 rpm por 10 minutos y se lavó varias veces con agua destilada estéril (Goksungur et al., 2002). Se adicionó 1mg de biomasa húmeda por cada ml de caldo de Hiroyasu que tenía los siguientes componentes (g/L): glicerol (20), peptona (5), KCl (5), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (2), NaH_2PO_4 (2) (Hiroyasu et al., 2006).

6.2.3. Evaluación de la capacidad de biosorción

Posteriormente se llevó a cabo una cinética de biosorción durante 50 horas para la cuantificación de la concentración residual del metal en el medio líquido usado por Hiroyasu (Figura 1). Se tomaron alicuotas del medio a los 0, 15, 30, 60 minutos (Goksungur et al., 2002), 3 horas, 12, 24, 36 y 48 horas (Hiroyasu et al., 2007) que luego fueron centrifugadas

por 15 minutos a 1 200 rpm y el sobrenadante fue analizado mediante absorción atómica en las instalaciones del Laboratorio Alex Stewart Assayer del Perú para determinar la cantidad de metal residual y por diferencia determinar el retenido en la biomasa (Garza, 2005).

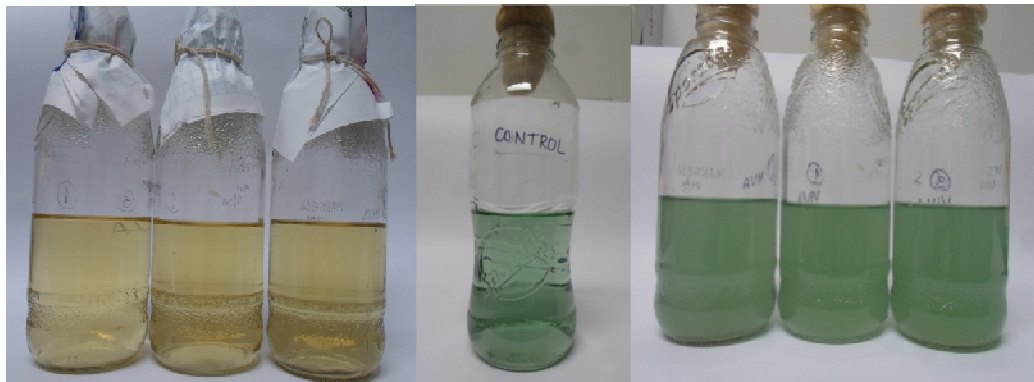


Figura 1. Caldo de Hiroyasu sin Cu (II) (izquierda), control con Cu (II) sin inóculo (centro) y con Cu (II) más inóculo (derecha).

6.2.4. Identificación molecular

Para la identificación presuntiva de las levaduras se analizó la secuencia de la region D1/D2 del RNAr 28S (Orbegozo et al., 2008), mediante el siguiente protocolo:

a. *Extracción de ADN genómico.*

Se usó el “*Wizard Genomic DNA Purification kit*” (Promega®) para la extracción. Se usaron 2 mL de un cultivo de 24 horas y se centrifugaron a 13 000 rpm por 2 minutos, luego se adicionó 600 µL de solución de lisis al sedimento y se sometió a 6 ciclos de shock térmico: 2 minutos en nitrógeno líquido/ 5 minutos en ebullición. Luego se adicionó 200 µL de solución de precipitación de proteínas, luego se agitó e incubó en hielo por 5 minutos para centrifugar a 13 000 rpm por 3 minutos. Se transfirió el sobrenadante a un tubo con 600 µL isopropanol a T° ambiente y se mezcló por inversión para centrifugar a 13 000 rpm por 2 minutos. Posteriormente se adicionó

al sobrenadante 600 µL de etanol al 70% y se centrifugó a 13 000 rpm por 2 minutos; se retiró el etanol y se dejó secar. A continuación se agregó 100 µL de solución de rehidratación de ADN e incubó a 37°C por 15 minutos y se dejó a 4°C toda la noche para rehidratar.

b. Iniciadores y condiciones de PCR.

Las secuencias de los iniciadores para amplificar la región D1/D2 LSU ribosomal fueron F63 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') y LR3 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'). Se usó la ADN polimerasa termoestable del "kit" *Platinum PCR supermix* (Invitrogen). El tamaño esperado del amplificado fue de 600 pb y se usó el siguiente protocolo de PCR: 3 minutos a 95°C; 30 segundos a 95°C; 30 segundos a 57°C, 2 minutos a 72°C, seguido de 30 ciclos, 5 minutos a 72°C y finalmente tiempo indefinido a 4°C (Orbegozo et al., 2008).

c. Electroforesis de DNA en geles de agarosa.

Como marcadores de estándares de tamaño molecular se usó 50 – 2 000 pb DNA "Ladder" (Novagen®). Se empleó gel de agarosa al 0.8% en buffer TAE al 1%, solución de carga (xylen cianol FF, orange G y glicerol). La electroforesis fue de 1 hora a 70 V. El gel fue teñido en bromuro de etido al 0.5% durante 2 minutos y se visualizó en un transiluminador UV.

d. Secuenciación de los productos de PCR.

Los amplificados fueron secuenciados por la empresa MACROGEN (SEOUL, COREA) para lo cual se envió 50 µL de amplificado por reacción.

e. Análisis bioinformático.

Las secuencias fueron editadas usando el programa Bioedit versión 7.1. Para ello, primero se analizó cada secuencia individualmente, comparando las bases mostradas con el ferograma. Una vez verificadas las bases, se halló el reverso complemento de una de las secuencias para que ambas se encuentren en el mismo sentido, luego se alinearon y generó la secuencia consenso. Esta secuencia fue la que se llevó al BLASTn (Orbegozo et al., 2008) y que permitió determinar el porcentaje de identidad respecto a las secuencias de la base de datos del “GeneBank”/European Nucleotide Archive/DNA Data Bank of Japan (“GeneBank”/ENA/DDBJ) correspondiente a algún género y especie de levadura.

f. Construcción del árbol filogenético

A partir de las secuencias obtenidas se construyó un árbol usando el programa MEGA versión 6. Para la construcción del árbol se usaron secuencias de las especies en estudio seleccionadas de la base de datos del “GeneBank”/ENA/DDBJ. El árbol filogenético se contruyó por Neighbor-Joining (González, 2014; Saitou y Nei, 1987).

6.2.5. Efecto del Cu (II) sobre las cepas

Al evaluar la resistencia al Cu (II) se usó agar y caldo a partir de los cuales se observaron los cambios morfológicos en las cepas por acción del cobre mediante observación de las colonias en medio sólido y coloración Gram tanto de medio líquido como sólido.

Para lo que respecta a microscopía electrónica, el proceso fue llevado a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Equipamiento Especializado de la Facultad de Ciencias

Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Las cepas fueron sometidas al siguiente tratamiento antes de ser observadas al microscopio:

- Fijación: Glutaraldehído al 2% en buffer fosfato 0.1 M a pH 7.2 por 6 a 24 horas a temperatura ambiente.
- Lavado: En buffer fosfato 0.2 M.
- Deshidratación: En etanol de graduación creciente (50%, 70%, 90% 100% y 100%) 5 a 10 minutos en cada uno.
- Montaje: En *stubs* de aluminio sobre cinta de carbon adhesiva.
- Metalización.

A continuación, las células de levaduras fueron observadas a diferentes aumentos: 1 000X, 1 360X y 20 000X para apreciar los cambios morfológicos.

7. RESULTADOS

7.1 Evaluación de la resistencia

La Tabla 3 muestra las cepas aisladas de ambientes mineros y su capacidad de resistencia a Cu (II). Se presentan sus códigos ya que la identificación molecular se realizó solo a las cepas más resistentes. Se puede observar que la cepa 9TS-500-1L es la que presentó mayor resistencia, siendo la única capaz de crecer en medio líquido con una concentración de 60 mM de Cu (II), mostrando gran crecimiento. La cepa 3TA-500-1K fue capaz de crecer en agar YPG conteniendo hasta 40 mM de Cu pero en medio líquido sólo hasta 20 mM. La cepa 8JS-500-1LK resistió hasta 30 mM de concentración tanto en medio líquido como en sólido. Las cepas 3JS-500-3LK y 13JA-250-1L resistieron hasta 30 mM pero sólo en medio sólido. Estas 5 cepas son las que presentaron mayor resistencia; las demás cepas presentaron resistencia igual o menor a 20 mM.

Si bien hubo crecimiento de las cepas conforme iban siendo trasladadas de menor a mayor concentración tanto en medio líquido como en sólido; éste no era constante, es decir, que el crecimiento era menor a partir de 20 mM en adelante, a excepción de la cepa 9TS-500-1L que mostró buen crecimiento en presencia del metal.

Tabla 3. Concentración Mínima Inhibitoria de 13 cepas de levaduras frente a Cu (II).

Cepa	5mM		10 mM		20 mM		30 mM		40 mM		60 mM
	Agar	Caldo	Agar	Caldo	Agar	Caldo	Agar	Caldo	Agar	Caldo	Caldo
9TS-500-1L	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7TS-500-1K	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
3TA-500-1K	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
1TS-500-2K	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
8TS-500-2	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
13JS-500-1LK	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
8JS-500-1LK	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
3JS-500-3LK	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
13JA-250-1L	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
4TA-500-1K	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
35SM	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
64SM	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
63SM	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-

7.2 Efectos del Cu (II) sobre la morfología de las cepas

Se observó cambios en la morfología de las cepas tanto de sus colonias como de las células en medio líquido al observarlas por tinción Gram y microscopía electrónica (Figuras 2 y 3).

Las colonias de levaduras se caracterizan por ser grandes, sin embargo al aumentar la concentración de Cu (II) en el medio de cultivo, las colonias se tornaron cada vez mas pequeñas conforme aumentaba la concentración de Cu (II) en el medio de cultivo. Por otro lado, el color inicialmente blanco de las colonias de levaduras también cambió pues empezó a tornarse color marrón verdoso; de igual manera, la intensidad del color iba en aumento junto con la elevación de la cantidad de Cu (II) presente en el medio.

Las cepas observadas mostraron cambios en su morfología celular tanto en medio líquido como en medio sólido; al inicio en ausencia de Cu (II), las células tipo levadura eran ovaladas, pero conforme fueron expuestas a mayores concentraciones de Cu (II) presentaron deformación y alargamiento de sus células, así como también formación de pseudohifas o crecimiento en cadenas. Además, los cambios anteriormente mencionados eran más evidentes en caldo a menor concentración respecto al medio sólido lo cual se evidenció tanto al observar las tinciones Gram como en la microscopía electrónica (Figuras 4,5 y 6).

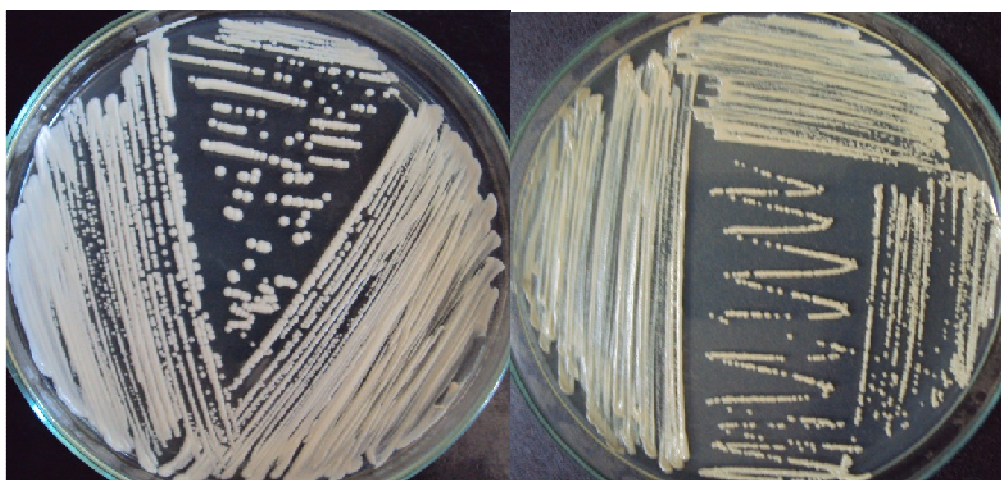


Figura 2. Cepa 8TS-500-2 en agar YPG con 1mM de Cu (II) (izquierda) y con 10 mM de Cu (II) (derecha).

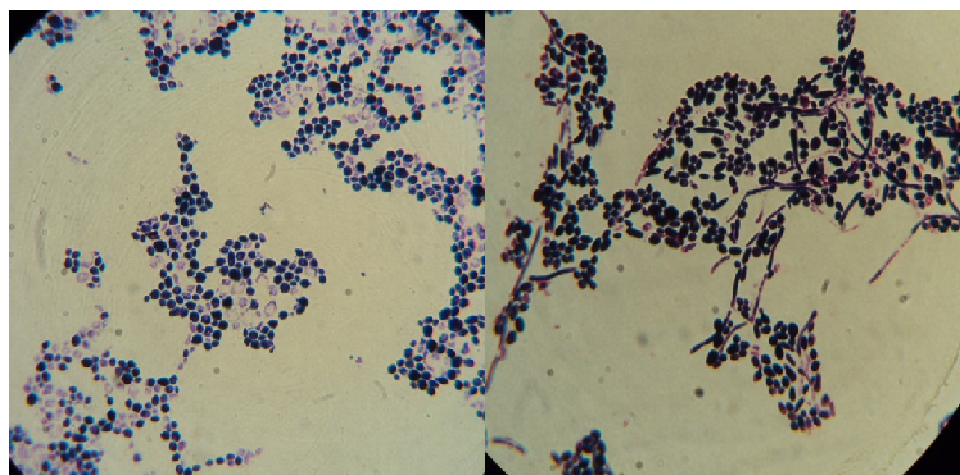


Figura 3. Coloración Gram de la cepa 3JS-500-3LK de la placa con YPG con 5 mM de Cu (II) (izquierda) y con 10 mM de Cu (II) (derecha) (1000X).

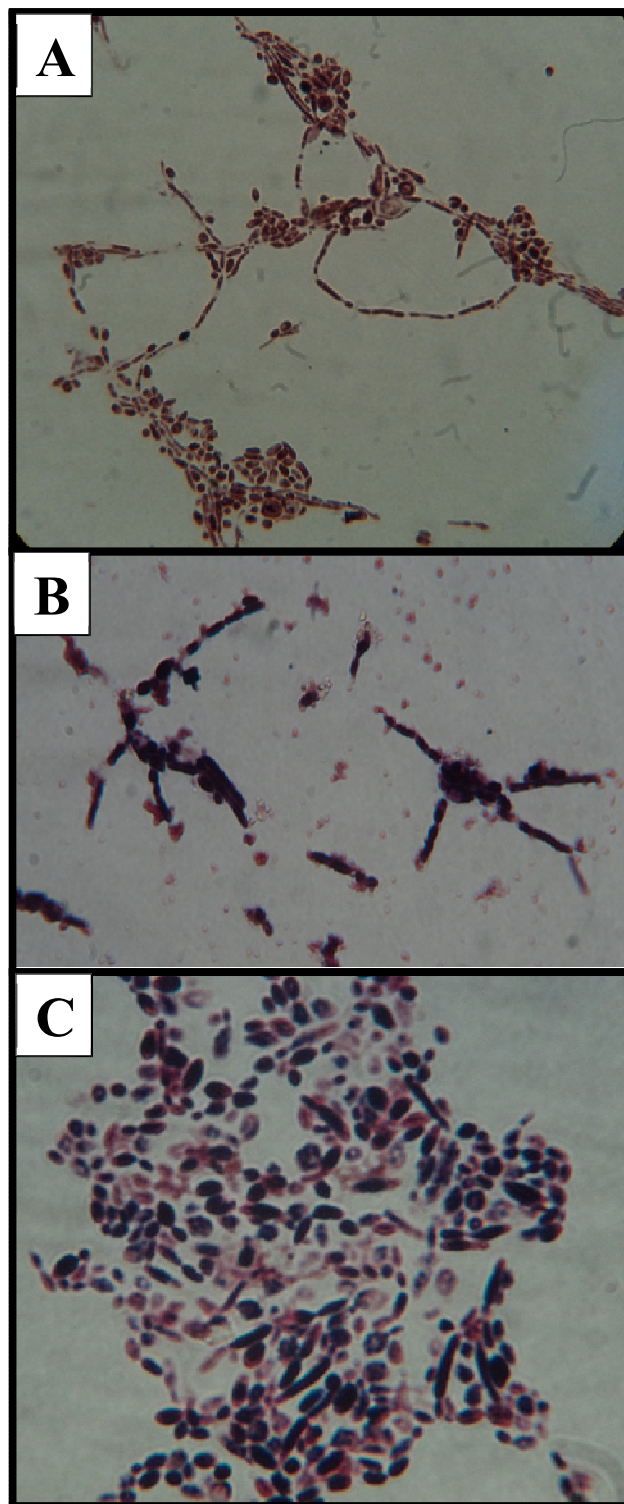


Figura 4. Coloración Gram de las cepa 3JS-500-3LK a partir de agar YPG conteniendo 15mM de Cu (II) (A) y 10 mM de Cu (II) (B y C) (1000X). En los tres casos se observa el alargamiento de las células.



Figura 5. Microscopía electrónica de la cepa 3JS-500-3LK en medio YPG con 1 Mm de Cu (II) (4000x).

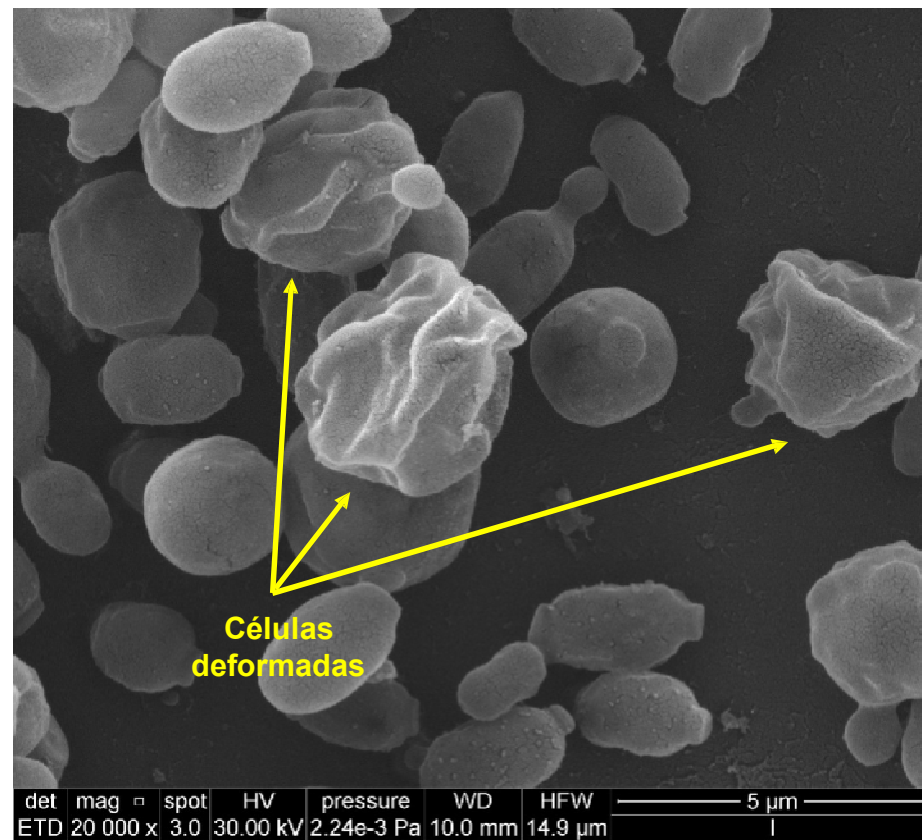


Figura 6. Microscopía electrónica de la cepa 3JS-500-3LK en medio YPG con 10 mM de Cu (II) (20000x).

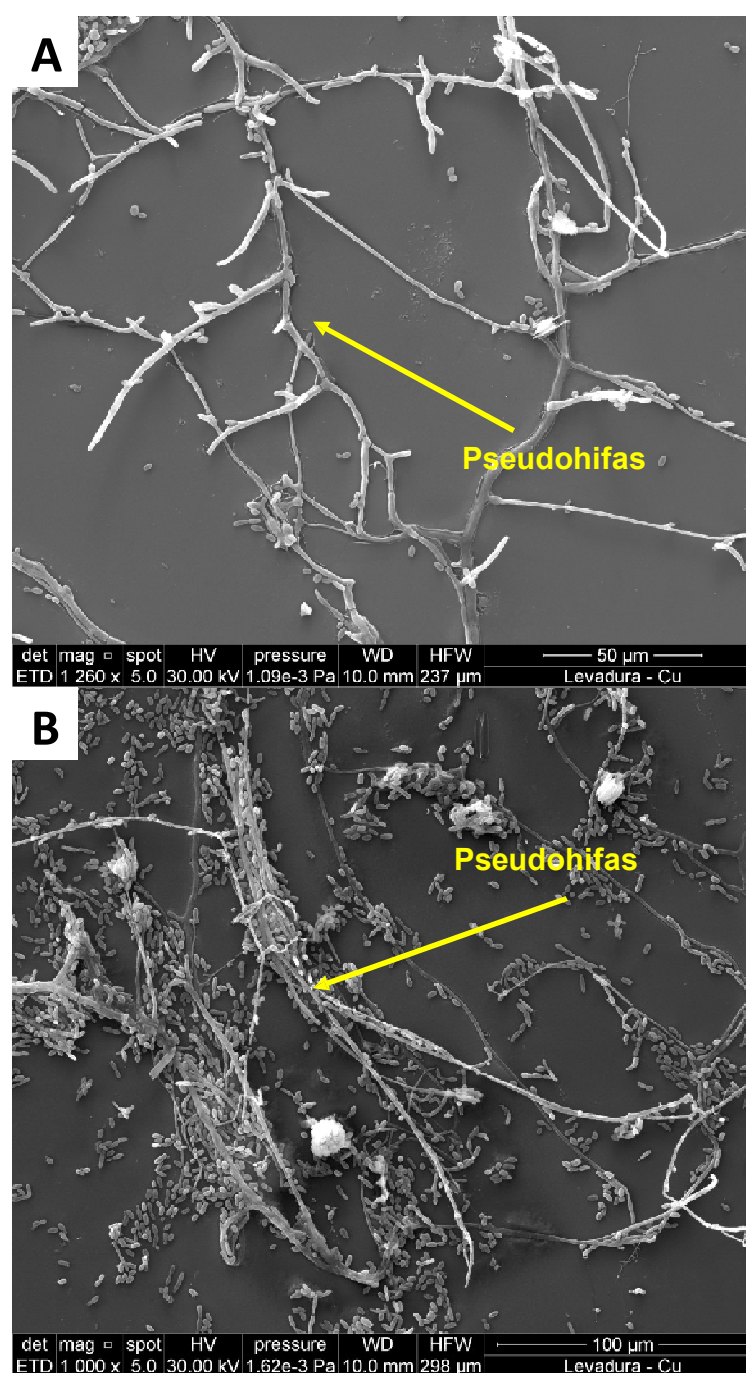


Figura 7. (A) Microscopía electrónica de la cepa 3JS-500-3LK a 1360x. (B) Microscopía electrónica de la cepa 3JS-500-3LK a 1000x. Ambos a 20mM de Cu (II). Se observa la formación de pseudohifas (flechas amarillas).

7.3. Evaluación de la capacidad de biosorción de la cepa 9TS-500-1L

Las alícuotas de cada tiempo se filtraron para retirar la biomasa y obtener solo el caldo (Figura 8). La biomasa muerta, cuya obtención se menciona en el apartado 6.2.2, sólo se analizó durante las tres primeras horas. Mientras que la biomasa viva se analizó hasta las 48 horas (Hiroyasu et al, 2007).

Conforme se iban colectando las alícuotas del grupo de biomasa viva en los diferentes tiempos, se observó un cambio de color del medio que pasó de ser azul intenso al inicio a ser verde amarillento al final, parecido al medio original (Figuras 9 y 10). Además, el análisis de absorción atómica del ensayo con biomasa viva mostró una disminución de 29.14% de cobre a las 48 horas, mientras que para la última alícuota de la biomasa muerta (3 horas) no se observó cambios de color y la disminución de cobre fue mucho menor como se muestra mas adelante (Tablas 4 y 5).

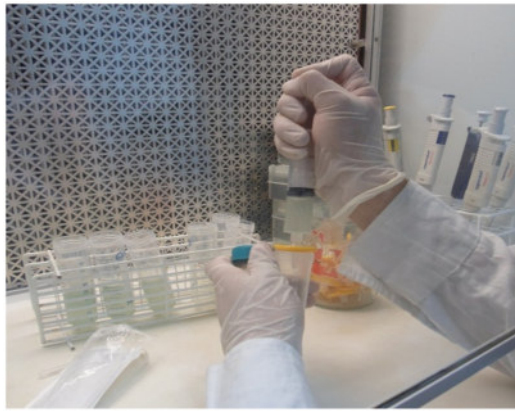


Figura 8. Filtración de las alícuotas.

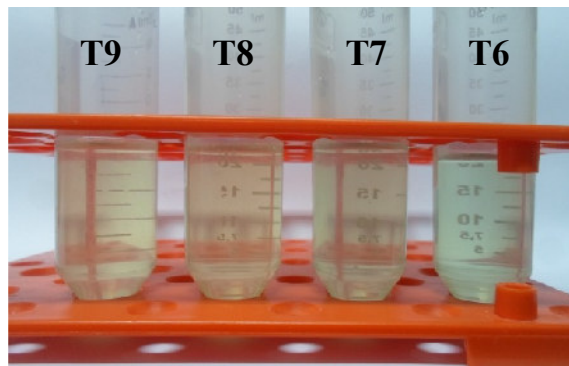


Figura 9. Sobrenadante de cinética de biosorción con biomasa viva filtrado. 48 horas (T9), 36 horas (T8), 24 horas (T7) y 3 horas (T6).

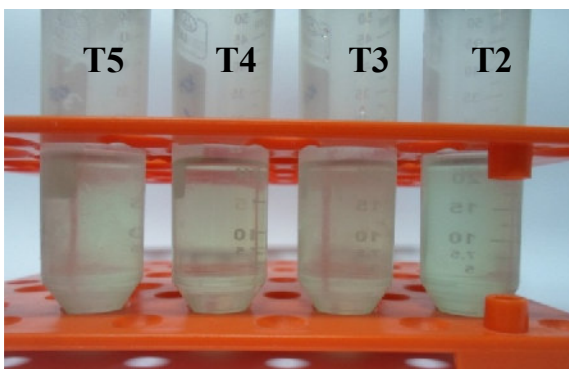


Figura 10. Sobrenadante de cinética de biosorción con biomasa muerta filtrado. 3 horas (T5), 60 min (T4), 30 min (T3) y 15 min (T2).

La cinética de biosorción con biomasa viva arrojó una disminución máxima de 29.14% de Cu a las 48 horas (Tiempo 9) (Tabla 4). El porcentaje de biosorción se obtuvo respecto a las 0 horas (Tiempo 1); es por ello que presenta 0 porcentaje en el tiempo 1. Se puede observar que hay una ligera variación ascendente y descendente de la cantidad del metal hasta el tiempo 5, a partir del cual comienza a elevarse el porcentaje de biosorción y por ende, la cantidad de Cu(II) disminuye (Figura 11 y 12).

En todos los tiempos los valores obtenidos del ensayo con biomasa viva son menores a los del ensayo control sin biomasa.

Tabla 4. Porcentaje de biosorción de Cu por biomasa viva de la cepa 9TS-500-1L

TIEMPO	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	0	15	30	1	3	12	24	36	48
	min	min	min	hora	horas	horas	horas	horas	horas
Cu mg/L	60.88	60.36	60.52	60.10	60.73	58.95	57.61	49.38	43.14
Blanco	61.94	62.57	62.36	61.85	62.17	62.57	61.91	61.08	61.69
%Biosorción	0	0.85	0.59	1.29	0.25	3.18	5.37	18.88	29.14

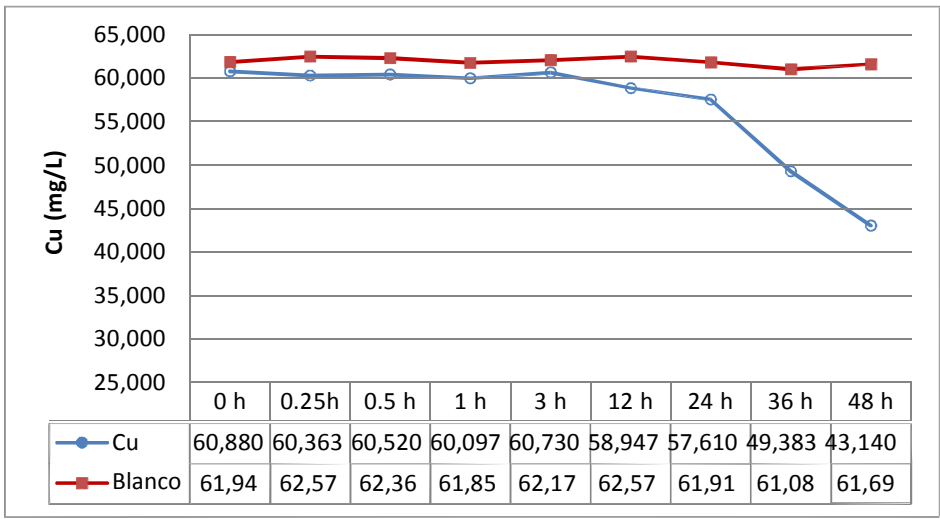


Figura 11. Cantidad de Cobre (II) en el sobrenadante de la cinética con biomasa viva de la cepa 9TS-500-1L a través del tiempo.

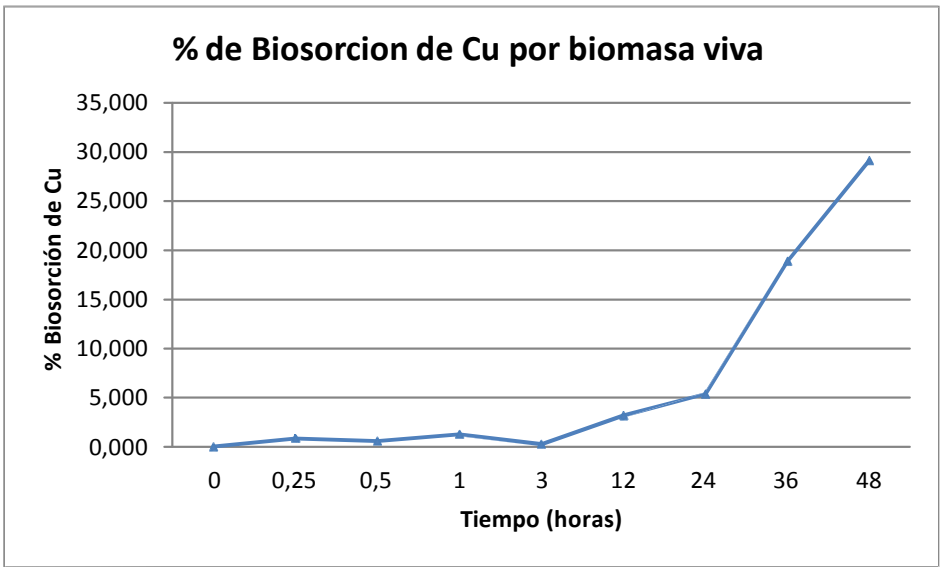


Figura 12. Porcentaje biosorción de Cu (II) en el sobrenadante por la biomasa viva de la cepa 9TS-500-1L a través del tiempo.

Tabla 5. Porcentaje de biosorción de Cu (II) por biomasa muerta de la cepa 9TS-500-1L

TIEMPO	1	2	3	4	5
	0 min	15 min	30 min	1 hora	3 horas
Cu mg/L	61.31	60.98	61.28	60.87	60.83
Blanco	61.94	62.57	62.36	61.85	62.17
%Biosorción	0	0.54	0.05	0.72	0.79

La cinética de biosorción con biomasa muerta arrojó una disminución máxima de 0.79% de Cu (II) a las 3 horas (Tiempo 5) (Tabla 5). El porcentaje de biosorción se obtuvo respecto al tiempo uno; es por ello que no se presenta ningún porcentaje en el tiempo 1. Se observa además que en el tiempo 3 hay un aumento en la cantidad de cobre respecto al tiempo 2 y luego vuelve a disminuir (Figura 13).

Los valores obtenidos del ensayo con biomasa muerta son siempre menores a los obtenidos del ensayo control sin biomasa.

Observando ambas tablas (Tabla 4 y 5) se puede apreciar que se obtuvieron mejores resultados cuando se trabajó con biomasa viva.

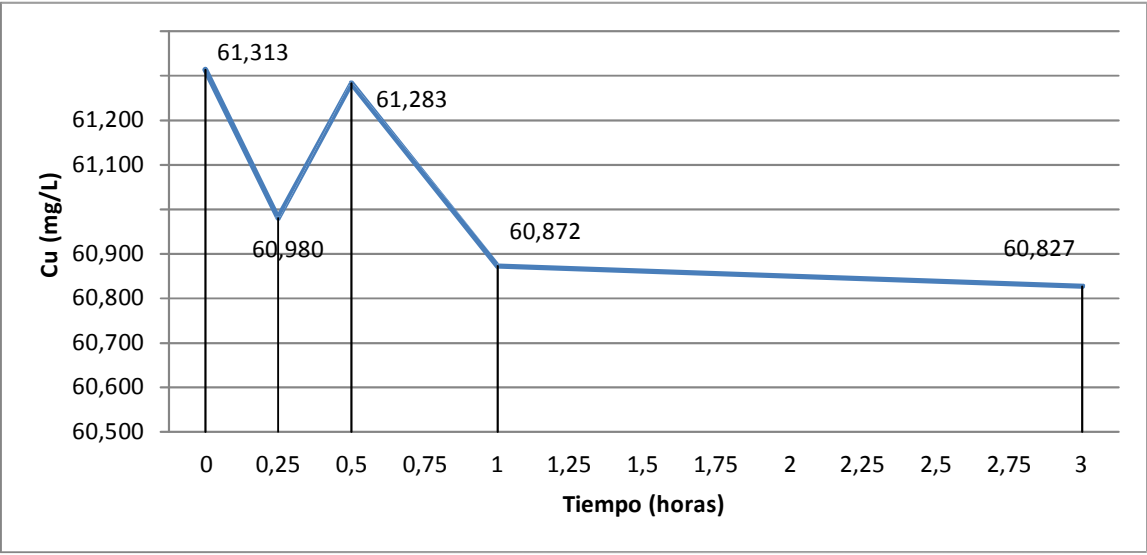


Figura 13. Cantidad de Cu (II) en el sobrenadante de la cinética con biomasa muerta de la cepa 9TS-500-1L a través del tiempo.

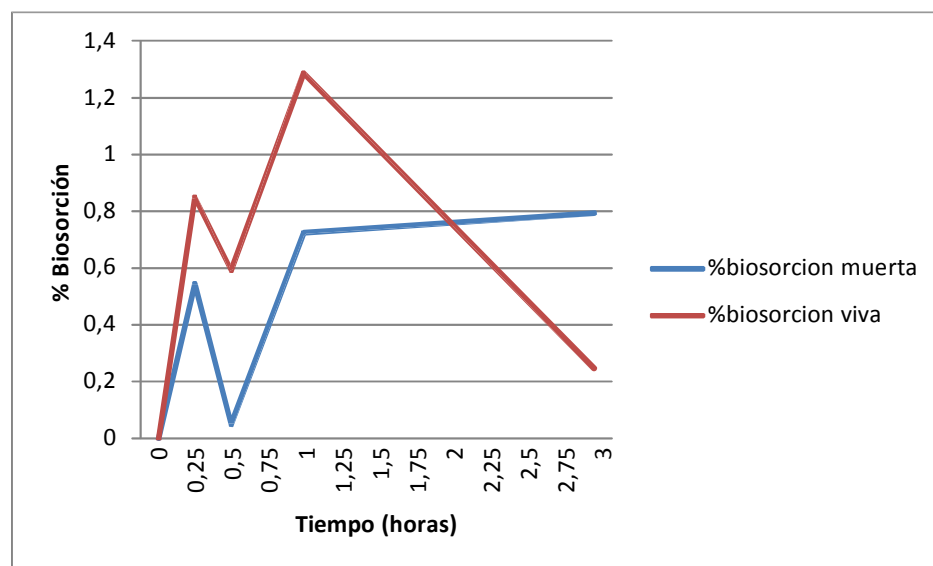


Figura 14. Comparación del porcentaje de biosorción de Cu (II) en los ensayos con biomasa viva y muerta de la cepa 9TS-500-1L.

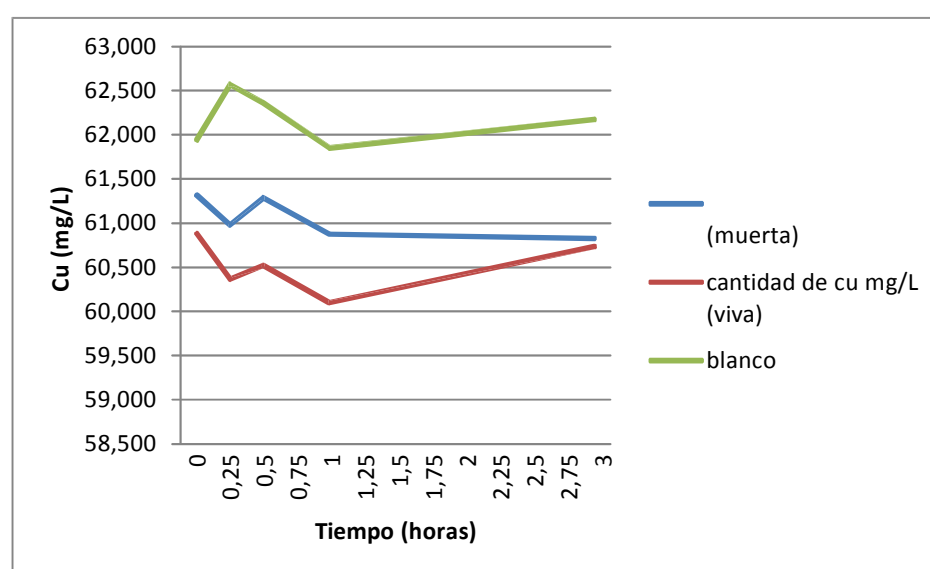


Figura 15. Comparación de la cantidad de Cu (II) en los ensayos con biomasa viva y muerta de la cepa 9TS-500-1L y control.

Para determinar si hubo un descenso significativo o no de la cantidad de cobre en el medio, se usó la prueba Z score.

Tabla 6. Z score de los valores de la cantidad de cobre del ensayo con biomasa viva

Tiempo (horas)	Cu mg/L Viva	Z score
0	60.880	0.641
0.25	60.363	0.558
0.5	60.520	0.583
1	60.097	0.516
3	60.730	0.617
12	58.947	0.333
24	57.610	0.121
36	49.383	-1.188
48	43.140	-2.181

De acuerdo a la Tabla 6 obtenida mediante el programa Minitab versión 17 se observa que el Z score de los datos sale dentro de lo considerado aceptable (desde -2 hasta +2) excepto uno. Para el valor de 43.140 mg/L que pertenece al último tiempo (48 horas). Como sabemos, los valores de Z score entre 2 y 3 son considerados cuestionables, de modo que se considera que este último valor puede ser significativamente diferente de los otros, es decir, que sí hubo una disminución significativa de la cantidad de Cu respecto a la cantidad inicial para el ensayo trabajado con biomasa viva.

Tabla 7. Z score de los valores de la cantidad de cobre del ensayo con biomasa muerta.

Tiempo (horas)	Cu mg/L Muerta	Z score
0	61.313	1.127
0.25	60.980	-0.328
0.5	61.283	0.996
1	60.872	-0.798
3	60.827	-0.997

Por otro lado, de acuerdo a la Tabla 7 obtenida también mediante el programa Minitab versión 17 se observa que el Z score de los datos se encuentra dentro de lo considerado aceptable, en otras palabras, los valores son cercanos y no ha habido una disminución de Cu significativa desde el inicio hasta el final del ensayo con biomasa muerta.

Para saber si los dos grupos de datos son o no significativamente diferentes se realizó la comparación de ambos usando herramientas estadísticas.

Primero se evaluaron la distribución de ambos grupos de datos luego se realizaron las pruebas de comparación de sus medidas de tendencia central y finalmente comparación de sus medidas de dispersión.

- Distribución de datos

Tabla 8. Resumen de los porcentajes de Biosorción con biomasa viva y muerta según los tiempos.

Tiempo (h)	% biosorción con B. viva	% biosorción con B. muerta
0	0	0
0.25	0.85	0.54
0.5	0.59	0.05
1	1.29	0.72
3	0.25	0.79
12	3.18	
24	5.37	
36	18.88	
48	29.14	

Ya que solo se pueden comparar los 5 primeros tiempos solo se toman los 5 primeros datos de cada columna de la Tabla 8 para evaluar si son o no significativamente diferentes y se aplicó la prueba de Anderson-Darling.

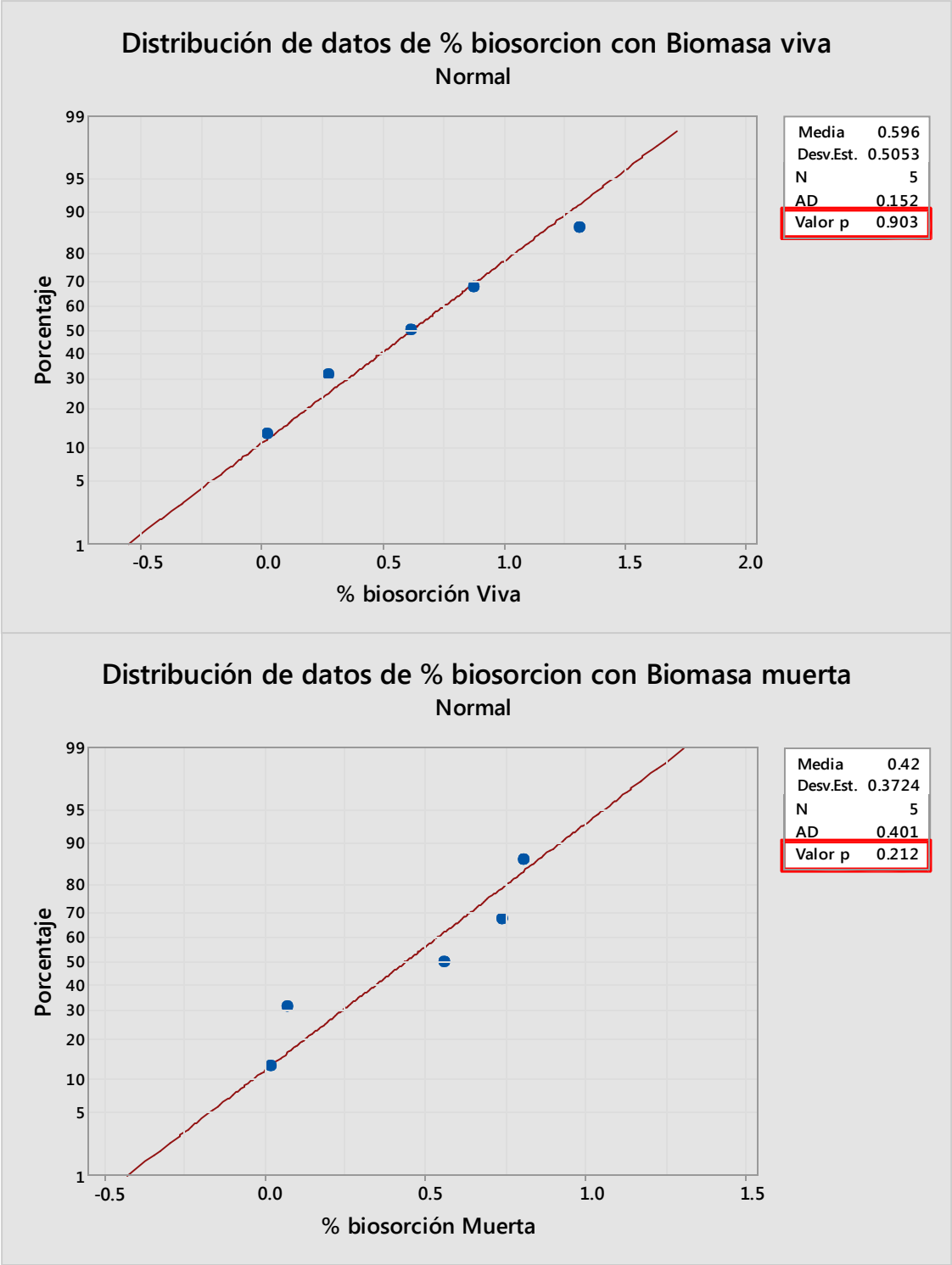


Figura 16. Gráficas de la distribución de los datos del % de biosorción de Cu con biomasa viva (arriba) y biomasa muerta (abajo).

Según las gráficas de la Figura 16 se observa que los P value son mayores al $\alpha=0.05$, por lo tanto se trata de datos con distribución normal en ambos casos. Entonces aplicamos T student para dos muestras para analizar sus promedios y Prueba F para analizar sus varianzas.

- Análisis de medidas de tendencia central de los grupos de datos

Se proponen dos hipótesis:

- Hipótesis nula (H_0): Los promedios de los grupos de datos son iguales
- Hipótesis alterna (H_a): Los promedios de los grupos de datos son diferentes

Prueba T e IC de dos muestras: % biosorción Viva, % biosorción Muerta

T de dos muestras para % biosorción Viva vs. % biosorción Muerta

				Error estándar de la media
	N	Media	Desv.Est.	
% biosorción Viva	5	0.596	0.505	0.23
% biosorción Muerta	5	0.420	0.372	0.17

Diferencia = μ (% biosorción Viva) - μ (% biosorción Muerta)
Estimación de la diferencia: 0.176
IC de 95% para la diferencia: (-0.488, 0.840)
Prueba T de diferencia = 0 (vs. \neq): Valor T = 0.63 Valor p = 0.551 GL = 7

Figura 17. Prueba T student de dos muestras (% biosorción con biomasa viva y con biomasa muerta) obtenida del programa Minitab versión 17.

En este caso ya que el P valor resultó ser mayor a 0.05 (Figura 17), entonces se acepta la hipótesis alterna, es decir, los promedios son iguales.

- Análisis de medidas de dispersión

Se proponen dos hipótesis:

- Hipótesis nula (H_0): Las varianzas de los grupos de datos son iguales
- Hipótesis alterna (H_a): Las varianzas de los grupos de datos son diferentes

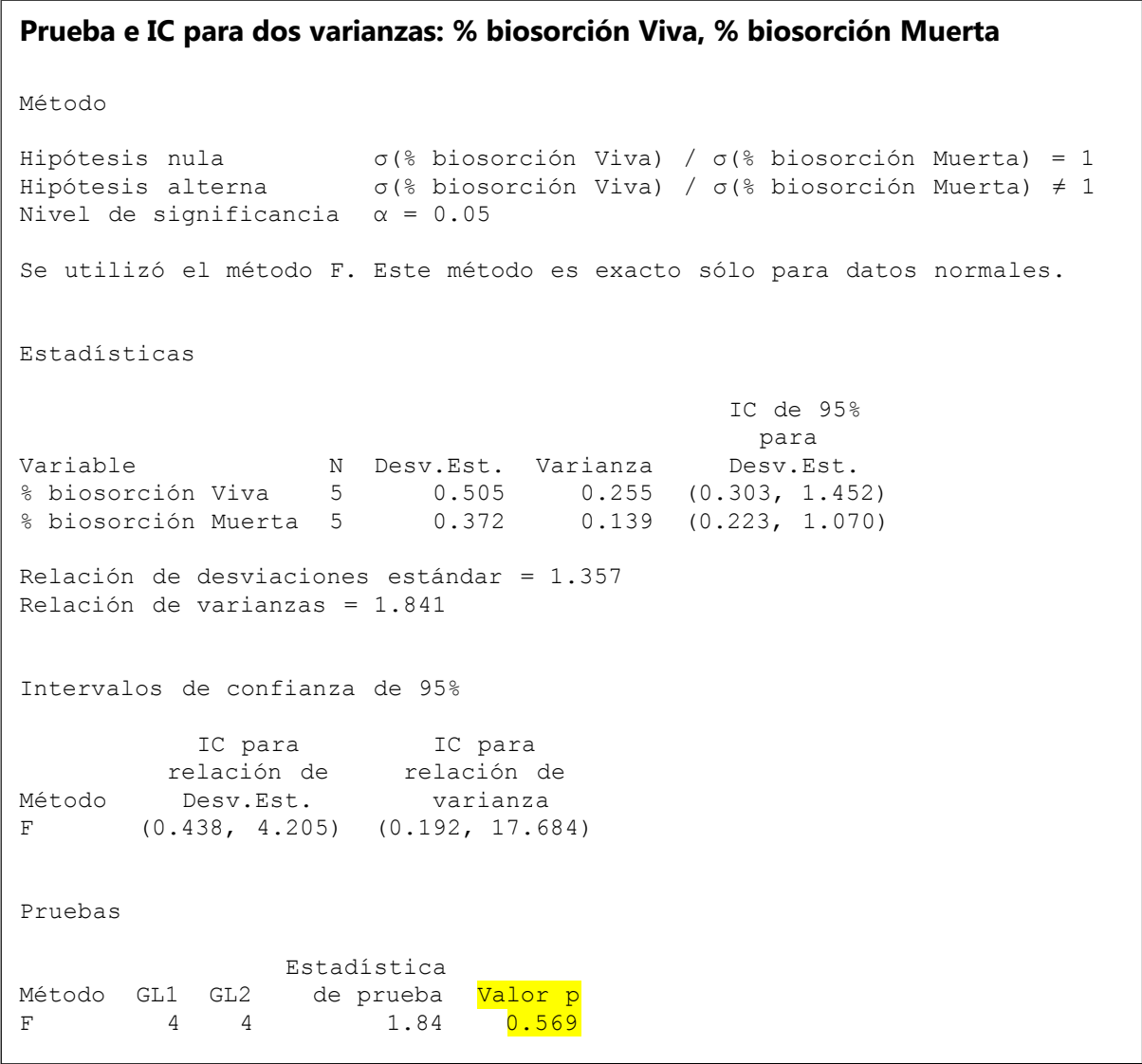


Figura 18. Prueba de análisis de varianzas para dos muestras (% de biosorción con biomasa viva y muerta) obtenida del programa Minitab versión 17.

De acuerdo a los resultados de la prueba F, se observa que el P valor es mayor a 0.05 (Figura 18), por ende, las varianzas son iguales.

Finalmente sabemos que:

Ambos grupos presentan distribución normal, que presentan varianzas y promedios iguales, entonces los grupos no son significativamente diferentes.

La Figura 14 muestra una comparación de los porcentajes de biosorción de los ensayos con biomasa viva y muerta, mientras que la figura 18 muestra la cantidad de Cu(II) en el sobrenadante de los 3 ensayos a través del tiempo durante 3 horas que es cuando acaba el ensayo con biomasa muerta. De acuerdo a los gráficos se observa que el ensayo que presenta mayor porcentaje de biosorción es el de la biomasa viva en el tiempo 4 con un valor de aproximadamente 1.29% . El máximo porcentaje de biosorción por la biomasa muerta se presenta en el tiempo 5.

Según la figura 13, la cantidad de cobre presentó una disminución (tiempo 2 y 4) y un aumento (tiempo 3 y 5) conforme transcurre el tiempo respecto al tiempo anterior para el caso de la biomasa viva. Para el caso de la biomasa muerta, solo se presentó un aumento en el tiempo 3 respecto al tiempo 2, los demás valores disminuyeron. Se observó también que las cinéticas de los ensayos con biomasa viva y muerta siguen patrones muy similares excepto al final (tiempo 5) y que en ambos casos los valores obtenidos, son menores a los del ensayo control (Figura 15).

7.4 Identificación molecular

7.4.1 Amplificación de la región D1/D2 del rRNA 28s

Se extrajo el DNA genómico con el “*Wizard Genomic DNA Purification Kit*” (Promega®) y se amplificó usando una Taq polimerasa comercial (Promega®); el producto de acuerdo a lo esperado era de 600 pb (Figura 19).

7.4.2 Análisis bioinformático

Los archivos de la secuenciación de las cepas se editaron en el programa Bioedit versión 7.1 logrando generar una secuencia consenso (Figuras 20 y 21) y posteriormente compararlas con la base de datos. Además se descargaron varias secuencias adicionales para usarlas en la elaboración del árbol filogenético en el programa MEGA versión 6 (Figura 23).

7.4.3 Determinación del género y especie

Los archivos de la secuenciación editados fueron luego comparados con la base de datos del GeneBank/ENA/DDBJ para asignar el género y especie de las cepas en estudio.

De acuerdo al análisis molecular, las cepas fueron ubicadas de la siguiente manera:

- La cepa 3JS 500 3LK presentó un 99 % de porcentaje de identidad con respecto a *Candida intermedia* ([AB281307.1](#)) (Figura 24).
- La cepa 3TA 500 1K presentó 100 % de identidad con respecto a *Candida tropicalis* ([KP064123.1](#)) (Figura 25).

- La cepa 9TS 500 1L, según el análisis bioinformático, es *Yarrowia lipolytica* con un 94% de identidad ([EU327112.1](#))
- La cepa 8JS 500 1LK, según el análisis bioinformático, es *Candida tropicalis* al 99% de identidad ([EU651853.1](#))
- La cepa 13JA 250 1L, según el análisis bioinformático, es *Candida intermedia* al 99% de identidad ([FJ455102.1](#))

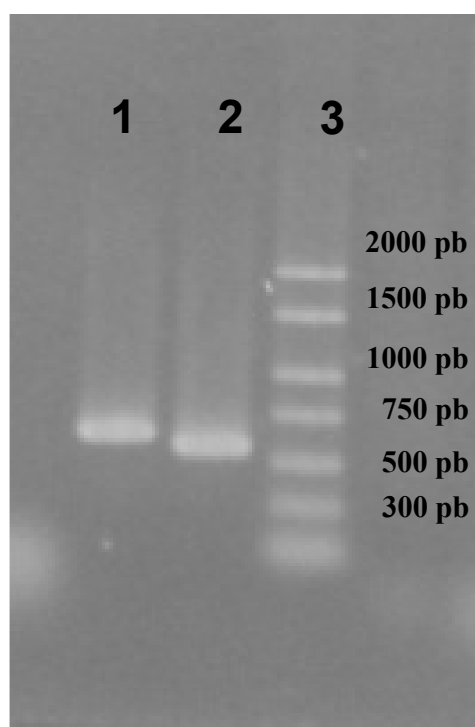


Figura 19. Electroforésis en gel de agarosa de los amplificados de las cepas. 1: 3TA-500-1K (600pb). 2: 3JS-500-3LK (600pb). 3: Ladder 50 – 2 000 pb DNA “Ladder” (Novagen®)

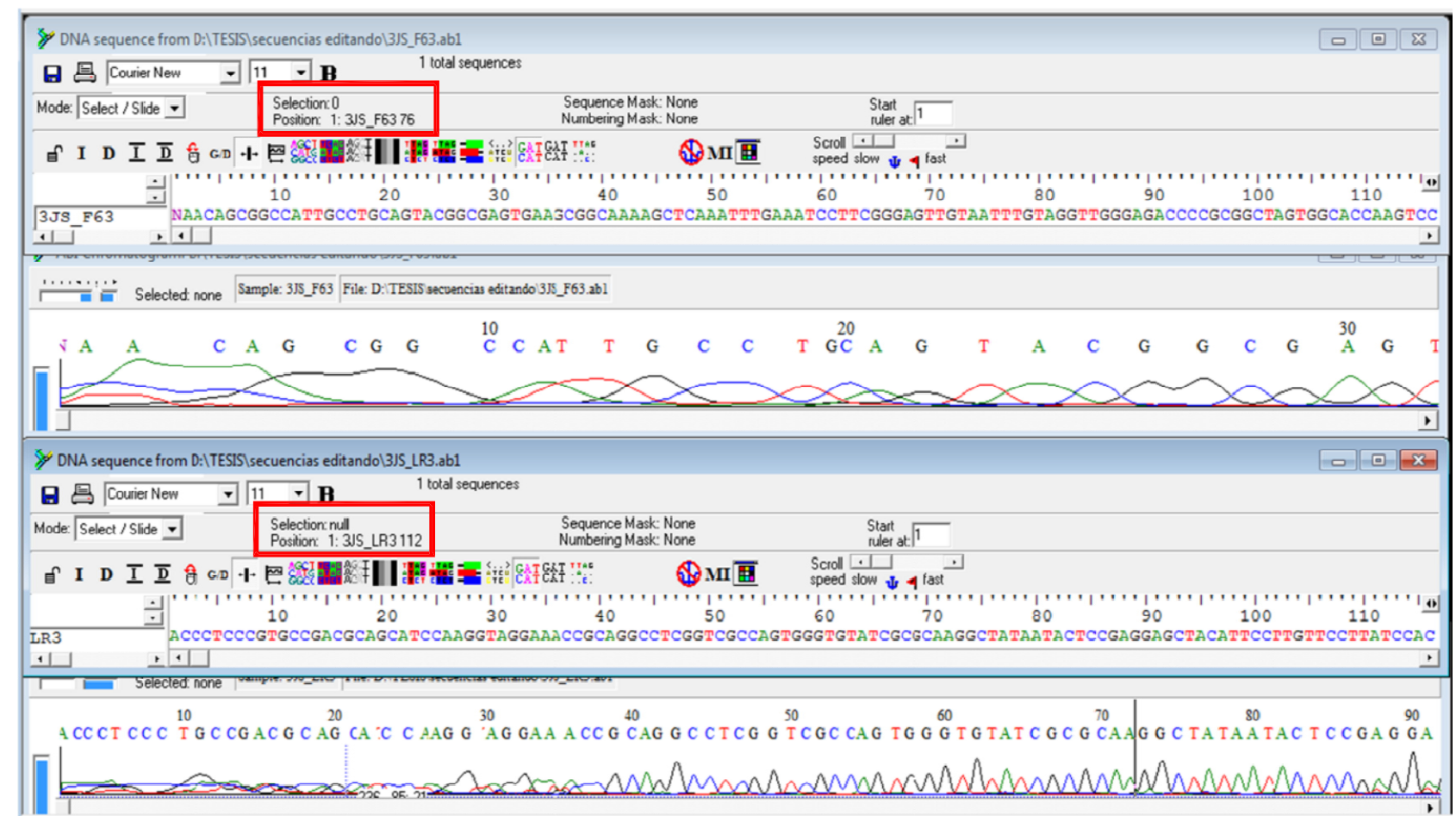


Figura 20. Secuencia Forward (izquierda) y Reverse (derecha) de la cepa 3JS 500 3LK en el programa Bioedit.

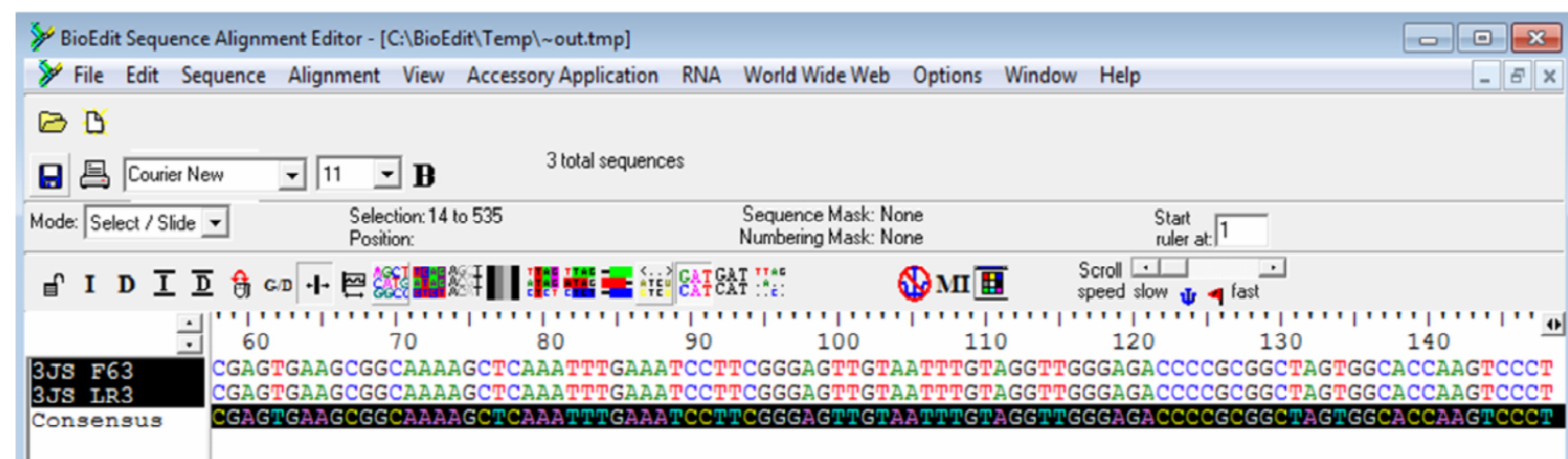


Figura 21. Secuencia consenso de la región D1/D2 del rRNA 28s de la cepa 3JS 500 3LK en el programa Bioedit.

7.5 Filogenia molecular

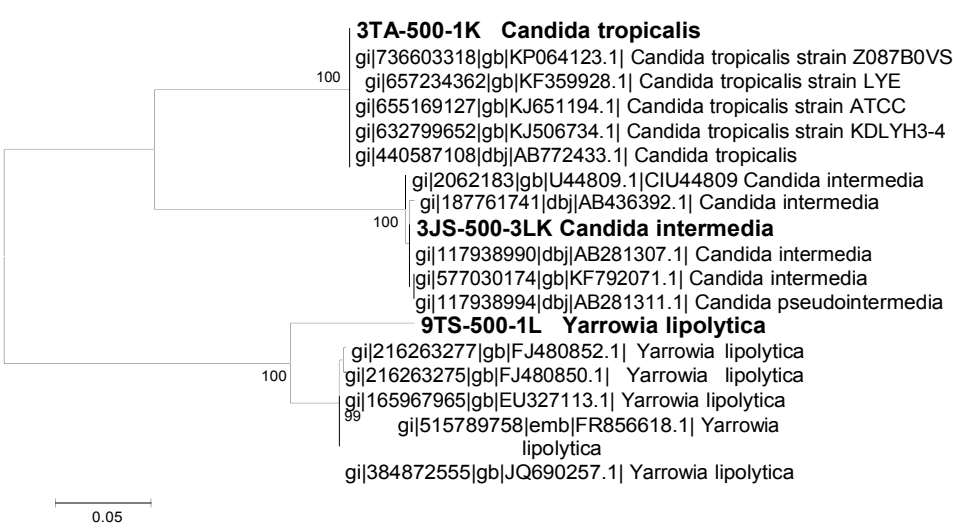


Figura 22. Árbol filogenético construido en el programa MEGA versión 6, con las secuencias de la base de datos del Gene Bank y con las secuencias estudiadas.

El árbol filogenético construido a partir de las secuencias del Genbank/ENA/DDBJ (Figura 22) muestra que las cepas identificadas pertenecen a los clados de *Candida tropicalis* y *Candida intermedia* mostrando que un 100% de los árboles realizados por el programa MEGA versión 6 coinciden con lo que se muestra. Mientras que para el caso de la cepa identificada como *Yarrowia lipolytica* se observa que está separada del resto de las secuencias pero dentro de un mismo clado, lo que corresponde con los resultados obtenidos en la identificación molecular, según la base de datos esta cepa corresponde sólo en un 94%.

Figura 23. Secuencias alineadas en el programa MEGA versión 6 para la construcción del árbol filogenético.

8. DISCUSIÓN

8.1 Evaluación de la resistencia

Las cepas con mayor resistencia 9TS-500-1L, 3TA-500-1K, 13JS-500-1LK, 8JS-500-1LK, 3JS-500-3LK y 13JA-250-1L superan ampliamente a lo reportado por la bibliografía donde encontraron MIC de 10 mM (Hiroyasu et al., 2007). Además, en el ensayo MIC la cepa 9TS-500-1L identificada como *Yarrowia lipolytica* presentó resistencia hasta 60 mM de concentración de Cu_2SO_4 que es 15 veces lo reportado por García et al., (2002) que sólo presentó 4 mM de MIC y 4 veces lo hallado por Olasupo et al., (1993) que reportó MIC de 15 mM en cepas de levaduras nigerianas.

De acuerdo a lo reportado por Hiroyasu et al., (2007b) la DL_{50} de *Yarrowia* fue de 5 mM mientras que en el presente trabajo, si bien no se verificó la muerte de las células, su crecimiento era inhibido recién con 60 mM de Cu_2SO_4 .

De acuerdo a la literatura, *Candida albicans* puede tolerar hasta 50 mM de Cu (Weissman et al., 2000); sin embargo, en el presente estudio se encontró una MIC de 40 mM de Cu(II) para este género. Es también conocido que para este género la capacidad de retención de los metales varía dependiendo de la especie (Singh, 2006; Olasupo et al., 1993). Así, se ha reportado que *Candida utilis* es capaz de retener 23 mg de Cu por gramo de biomasa seca (Muter et al., 2002).

Por otro lado, en bacterias como *Pseudomonas* la acumulación de Cu (II) ocurre en el periplasma y membrana externa y por ello cambia su coloración; mientras que en levaduras el Cu (II) es reducido en una primera instancia a Cu (I) y luego llevado al medio intracelular (Nies, 1999) lo que supone que no habrá cambio de color pues la pigmentación marrón de

Yarrowia es estimulada por metales como el cadmio y no por cobre (Carreira y Loureiro, 1998). Sin embargo, en el presente trabajo se observó el cambio de color con Cu (II) en todas las cepas estudiadas incluyendo a *Yarrowia*. Estos resultados concuerdan con estudios que indican que los polisacáridos que se une al metal dan color verde, en este caso, la melaninas (Göksungur et al., 2003; Hiroyasu et al., 2007), así como también, concuerdan con que es posible que esta coloración ocurra también en levaduras (Gadd & Griffiths, 1980).

8.2. Evaluación de la capacidad de biosorción de la cepa 9TS-500-1L

Según Göksungur et al., (2003), para la concentración de biomasa de 1mg/ml a los 120 minutos aproximadamente, debería haber una reducción de alrededor del 50% de Cu (II) en el medio; llevando a cabo la cinética con biomasa muerta de *Saccharomyces*, resultados que superan los del presente estudio pues se trabajó con la cepa de *Yarrowia*; sin embargo, *Yarrowia spp.* presenta mayor resistencia a cobre que *Saccharomyces spp.* y otras levaduras lo que concuerda con investigaciones anteriores (García et al., 2002; Fogel y Welch, 1982).

Generalmente el metal se adsorbe durante los primeros 5 minutos (Göksungur et al. 2003) contrario a lo ocurrido en este estudio, a pesar que el pH 6 del medio de cultivo favorece la interacción de los iones metálicos con la superficie celular. Sin embargo, la cantidad de biomasa pudo también ser un factor importante ya que a más biomasa presente, menor será la biosorción del metal (Tálos et al., 2009).

Quizás la presencia de materia orgánica de los componentes del medio de cultivo afectó los resultados del proceso de biosorción del metal pues, en vista que se trabajó también con biomasa viva, era necesaria una fuente de nutrientes para la cepa. La escasa

disminución de cantidad de Cu se explicaría porque el incremento de la fuerza iónica disminuiría la biosorción debido al incremento de carga electrostática (Schiewer y Volesky, 1997a, 1997b). Además, el cobre causa un incremento en la permeabilidad de la membrana celular en células vivas lo que permite el ingreso del Cu pero también su salida y por ende poca retención, a pesar de que en la parte externa el metal se acumula en los componentes de la pared celular como el quitosano (Stoll, 1996). *Yarrowia* ha sido usada en aplicaciones de biorremediación debido a las características de su pared celular y producción de surfactantes (Coelho et al., 2010).

Generalmente la biomasa muerta biosorbe mejor (Horikoshi et al., 1981) pero en el presente estudio la diferencia no fue muy significativa, ya que sólo difieren en 0.52% para el tiempo 5. Sin embargo hay estudios que muestran lo contrario, es decir mejores resultados con biomasa viva (Junghans y Straube, 1991; Vargas-García et al., 2010). Luego de 48 horas, la cinética con biomasa viva alcanza casi el 30 % de disminución de cobre respecto al tiempo inicial. No se siguió con la cinética con biomasa muerta pues las referencias indican que el tiempo en el que alcanza su máximo punto de biosorción no supera las tres horas de iniciado el proceso (Junghans y Straube, 1991; Stoll, 1996; Göksungur et al. 2003; Tálos et al., 2009). Quizás los resultados no fueron mejores con la biomasa viva porque *Yarrowia* cuenta con un sistema de flujo de metales que se induce cuando las concentraciones de metal superan un umbral límite (Hiroyasu et al., 2003) o probablemente porque las partículas que se unen con el metal pueden desnaturalizarse por agentes químicos, lo que explica por qué se obtuvo un bajo porcentaje de biosorción (Göksungur et al. 2003).

Tomando en cuenta los mismos tiempos tanto para la biomasa viva y muerta, al compararlos, se observa que la biomasa viva presentó mayor capacidad de biosorción

respecto a la muerta, siendo el mejor valor el del tiempo 4 (0.78 mg/L en 1 hora). Es más, si comparamos el mejor tiempo para la biomasa muerta (T5) aun así el valor de cobre retenido no supera al obtenido en el tiempo 4 por la biomasa viva (Figura 17). Lo cual tambien se puede apreciar en la Figura 16 que muestra los valores en porcentajes. El mayor porcentaje de biosorción con biomasa viva corresponde al tiempo 4 que es el unico valor que supera el 1%.

8.3 Efectos del Cu (II) sobre la morfología de las cepas

Las cepas mostraron cambios en su morfología al someterlas al contacto con Cu pues éste es un mecanismo de defensa a condiciones adversas (Coelho et al., 2010), sin embargo, otros estudios prefieren usar cepas mutantes que solo presentan crecimiento tipo levadura para examinar las características de su resistencia a cobre u otro metal (Hiroyasu et al., 2007) ya que la naturaleza dimórfica de *Yarrowia* complica la cuantificación del crecimiento, viabilidad así como otras respuestas fisiológicas (Hiroyasu et al., 2007). El Cu(II) estimula la producción de melanina que es causante del cambio de color de las células y durante el crecimiento tardío promueve el crecimiento filamentoso o formas miceliales en levaduras (Gadd & Griffiths, 1980). La importancia del cobre para la síntesis de melanina es explicada por la participación de la tirosina oxidasa, una enzima dependiente de cobre, que es uno de las enzimas clave en la ruta sintética (Bull, 1972).

8.4 Identificación molecular

Si bien las cepas de levaduras patógenas se logran identificar fácilmente con los kits comerciales como Remel y API 20C; para el caso de cepas ambientales se hace necesaria la aplicación de metodos moleculares ya que muchas de ellas son raras y poco estudiadas (Orbegozo et al., 2008).

Tres de las cuatro cepas identificadas molecularmente usando la región D1/D2 del RNAr 28S obtuvieron altos porcentajes de identidad respecto a la base de datos de GeneBank/ENA/DDBJ que indica su género y especie con claridad, sin embargo, cuando se realizó el Blastn de la cepa 9TS 500 1L se obtuvo un porcentaje de identidad del 94% respecto a *Yarrowia lipolytica*, resultado que no asegura que esa sea la especie de la cepa trabajada. Entonces, probablemente usando una región adicional se podría obtener un mejor resultado, un porcentaje de identidad más alto y con ello una mayor seguridad de la identidad de la cepa trabajada a pesar de que la secuencia usada es un buen marcador taxónomico debido a su alta divergencia en el dominio D2.

9. CONCLUSIONES

- La cepa de *Yarrowia lipolytica*, 9TS 500 1L, presentó una gran capacidad de resistencia al cobre “in vitro”.
- La cepa *Yarrowia lipolytica*, 9TS 500 1L, no presenta potencial para ser usada en procesos de biosorción de cobre con biomasa muerta pues solo logró biosorber 0.48 mg de cobre, es decir, el 0.79%. Lo que está respaldado por la prueba estadística t student.
- No hay diferencia significativa entre el ensayo con biomasa viva y biomasa muerta según arrojan las pruebas estadísticas; sin embargo, la biomasa viva arrojó ligeramente mejores resultados de biosorción respecto a la biomasa muerta para los mismos tiempos.
- El cobre provoca cambios en la morfología celular, formación de pseudohifas deformación de las células y cambio del color y tamaño de las colonias

10. RECOMENDACIONES

- Las cepas trabajadas 3TA 500 1K (*Candida tropicalis*), 3JS 500 3LK (*Candida intermedia*), 8JS 500 1LK (*Candida tropicalis*) y 13JA 250 1L (*Candida intermedia*) que toleran cobre hasta concentraciones de 40 mM pueden ser potenciales biosorbentes de cobre.
- Se recomienda realizar ensayos de cinética de biosorción con las cepas que superaron los 20 mM de concentración mínima inhibitoria.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ábalos A. & J. Nápoles. 2011. Biorremediación de ecosistemas contaminados con xenobióticos. Centro de estudios de biotecnología industrial. Universidad de Oriente.

<http://monografias.uo.edu.cu/index.php/monografias/article/view/4/6>

Acosta I., J. Cárdenas y V. Martínez. 2012. El uso de diferentes biomásas para la eliminación de metales pesados de sitios contaminados. *Ide@s CONCYTEG* 7(85): 911-922.

Antibi E. & D. Fishlock. 1980. *Biotechnology*. MIT Press, London.

Atkinson, B., F Bux y H. Kassan. 1998. Considerations for application of biosorption technology to remediate metal-contaminated industrial effluents. *Water SA* 24: 129-135.

Atlas R & Bartha R. 2002. *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. Ed. Addison Wesley. Madrid.

Avery S., N. Howlett y S. Radice. 1996. Copper Toxicity towards *Saccharomyces cerevisiae*: Dependence on Plasma Membrane Fatty Acid Composition. *Applied and environmental microbiology* 59: 2851–2856.

Benavides J., G. Quintero, A. Guevara, D. Jaimes, S. Gutiérrez y J. Miranda. 2006. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del

petróleo. Revista NOVA – Publicación Científica en ciencias biomédicas 4(5): 82-90.

Breierova, E., I. Vajczikova, V. Sasinkova, E. Stratilova, M. Fiserac, T. Gregorc y J. Sajbidord. 2002. Biosorption of cadmium ions by different yeast species. Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, Tübingen 57(C): 634-639.

Bull, A. 1972. Environmental factors influencing the synthesis and excretion of exocellular macromolecules. Journal of Applied Chemistry and Biotechnology 22(2): 261–292.

Cañizares, R. 2000. Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. Revista Latinoamericana de Microbiología 42(1): 131-143.

Carreira, A. & V. Loureiro. 1998. A differential medium to detect *Yarrowia lipolytica* within 24 hours. J. of Food Mycology 1(1): 3-12.

Carro B., M. Moctezuma e I. Acosta. 2002. Remoción de cromo (VI) por la biomasa celular de la levadura capsulada *Cryptococcus neoformans*. Centro de Investigación y de Estudios de Posgrado. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Castells X. 2000. Reciclaje de residuos industriales, Editorial Diaz de Santos S.A: Madrid.

Coelho M., P. Amaral e I. Belo. 2010. Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Biotechnology. Editorial Formatex. Español 2: 930-944.

Cuevas G. 2008. Remoción de hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA'S) utilizando reactores de suelos activados inoculados biológicamente. Tesis para obtener el grado de maestría en ciencias en ingeniería ambiental. Instituto Politécnico Nacional. Escuela Superior de Ingeniería y Arquitectura. Unidad de Zacatenco, México.

Dávila Guzmán Nancy. 2012. Caracterización del proceso de biosorción de metales pesados mediante residuos sólidos de café Tesis para obtener el grado académico de Doctor en Ciencias con orientación en Procesos sustentables. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Nuevo León – México.

Deley A. 2010. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo del campamento 161 utilizando el hongo *Pleurotus ostreatus*. Tesis para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Ambiental. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Escuela de Ciencias Químicas. Riobamba, Ecuador.

Fogel S. & J. Welch. 1982. Tandem gene amplification mediates copper resistance in yeast. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A* 78: 5342-5346.

Fu F. & Wang Q. 2011. Removal of heavy metal ions from wastewaters: A review, *Journal of Environmental Management* 92: 407-418.

Gadd G & A. Griffiths. 1980. Effect of copper on morphology of *Aureobasidium pullulans*. [*Transactions of the British Mycological Society*](#) 74(2): 387-392.

Gadd G. M. 1987. Fungal response towards heavy metals. In *Microbes in Extreme Environments* (Edited by Herbert R. A. and Codd G. A.). Academic Press, London.

Gadd, G. M. 2009. Biosorption: critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 84(1): 13-28.

García, S., M. Prado, R. Dégano y A. Domínguez. 2002. A Copper-responsive transcription factor, CRF1, mediates copper and cadmium resistance in *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Biological Chemistry* 277(40): 37359-37368.

Garza M. 2005. Aislamiento de microorganismos con alta capacidad de tolerar y remover Pb(II), r(VI), Cd(II), Cu(II), Zn(II) y Ni(II). Tesis para optar el grado de doctor en ciencias biológicas. Universidad de La Habana.

Göksungur Y., S. Üren y U. Güvenc. 2003. Biosorption of Copper ions by caustic treated waste baker's yeast biomass. *Turkey Journal of Biology* 27: 23-29.

Gomes L., N. Alexandrino, K. Roncato Duarte y F. Andrino. 2011. Cadmium biosorption by immobilized dead yeast cells from bioethanol industries. *International Journal of Environmental Resources* 5(4): 833-836.

Gutiérrez J., A. Espino, A. Coreño, F. Acevedo, G. Reyna, F. Fernandez, A. Tomasini, K. Wrobel y K. Wrobel. 2010. Mecanismos de interacción con cromo y aplicaciones biotecnológicas en hongos. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental Algal* 1 (1):47-63.

González A. 2014. Identificación molecular y métodos de conservación de levaduras y hongos filamentosos de muestras provenientes de la Antártida. Tesis de grado de Licenciatura de Ciencias Biológicas. Universidad de la República.

Hiroyasu I., I. Masahiro, T. Hiroshi y J. Masanori. 2007(a). Copper extrusion after accumulation during growth of copper-tolerant yeast *Yarrowia lipolytica*. Department of biology, Faculty of science, Ehime University, Japan. Zeitschrift für Naturforschung 62:77-82.

Hiroyasu I., I. Masahiro, T. Hiroshi y J. Masanori. 2007(b). Characteristics of copper tolerance in *Yarrowia lipolytica*. Biometals 20:773-780.

Hlihor, R., M. Diaconu, D. Fertu, C. Chelaru, I. Sandu, T. Tavares y M. Gavrilesu. 2013. Bioremediation of Cr(VI) polluted wastewaters by sorption on heat inactivated *Saccharomyces cerevisiae* biomass. International Journal of Enviromental Research 7(3): 581-594.

Horikoshi T., A. Nakajima y T. Sakaguchi. 1981. Studies on the accumulation of heavy metal elements in biological systems. European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology 12: 90-96.

Huangi C-P, C-P Huang y A. Morehart. 1990. The removal of Cu(II) from dilute aqueous Solutions by *Saccharomyces cerevisiae*.. Water Research Journal 24(4): 433-439.

Jo W., A. Loguinov, M. Chang, H. Wintz, C. Nislow, A. Arkin, G. Giaever y C. Vulpe. 2008. Identification of Genes Involved in the Toxic Response of *Saccharomyces cerevisiae* against Iron and Copper Overload by Parallel Analysis of Deletion Mutants. *Toxicological Sciences* 101(1): 140–151.

Junghans, K. & G. Straube. 1991. Biosorption of copper by yeast. *Biology of Metals* 4: 233-237.

Kirova G., Z. Velkova y V. Gochev. 2012. Copper (II) removal by heat inactivated *Streptomyces fradiae* biomass: Surface chemistry characterization of the biosorbent. *Journal of BioScience and Biotechnology*. SE/online: 77-82.

Kotrba P., M. Mackova y T. Macek. 2011. Microbial Biosorption of Metals. DOI 10.1007/978-94-007-0443-5_2. Springer Science Business Media B.V 2: 7-17, capitulo 6 pp148.

Laskowaki J. 1973. Fundamentos de fisico química de la mineralogía, Universidad de la Concepción: Concepción.

Lavalle L., M. Portillo, P. Chiacchiarini y E. Donati. 2007. Tolerancia a metales pesados y biosorción de cobre en levaduras aisladas en la Norpatagonia Argentina. I Jornadas Patagónicas de Biología de Levaduras – Bariloche.

Linder M., L. Wooten, P. Cerveza, S. Cotten, R. Schulze y N. Lomeli. 1998. Cooper transport. *American Journal of Clinical Nutrition* 67(5): 965-971.

Machado M., H. Soares y E. Soares. 2010(a). Removal of chromium, copper, and nickel from an electroplating effluent using a flocculent brewer's yeast strain of *Saccharomyces cerevisiae*. Water, Air and Soil Pollution 12 (1-4): 199–204.

Machado M., E. Soares y H. Soares. 2010(b). Removal of heavy metals using a brewer's yeast strain of *Saccharomyces cerevisiae*: Chemical speciation as a tool in the prediction and improving of treatment efficiency of real electroplating effluents. Journal of Hazardous Materials 180: 347–353.

Malik A. 2006. Environmental Microbiology. Centre for Rural Development & Technology Indian Institute of Technology Delhi.

Marín R. 2003. Fisicoquímica y microbiología de los medios acuáticos: tratamiento y control de calidad de agua, Ediciones Diaz de Santos. S.A: Madrid.

Martín M. 2008. Caracterización y aplicación de biomasa residual a la eliminación de metales pesados. Universidad de Granada. Facultad de ciencias. Departamento de ingeniería química. Tesis doctoral.

Mejía G. 2006. Aproximación teórica a la biosorción de metales pesados por medio de microorganismos. Revista CES medicina, veterinaria y zootecnia 1(1): 77-99.

Muñoz J. 2007. Biosorción de plomo (II) por cascara de naranja *Citrus cinensis* pretratada. Tesis para obtener el título profesional de químico. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. EAP. Química.

Muter O., I. Lubinya, D. Millers, L. Grigorjeva, E. Ventinya y A. Rapoport. 2002. Cr (VI) sorption by intact and dehydrated *Candida utilis* cells in the presence of other metals. Process Biochemistry Journal 38: 123-131.

Navarro A., K. Ramos, K. Campos, H. Maldonado. 2006 (A). Elucidación del efecto del pH en la adsorción de metales pesados mediante biopolímeros naturales: cationes divalentes y superficies activas. Revista Iberoamericana de Polímeros. Volumen 7(2): 113 -126

Navarro A., K. Ramos, R. Agapito y N. Cuizano. 2006 (B). Propiedades ácido-básicas de *Lentinus edodes* y cinética de biosorción de Cadmio (II) Revista Latinoamericana de Recursos Naturales 2(2): 47-54.

Nies, D. 1999. Microbial heavy metal resistance. Applied Microbiology and Biotechnology 51: 730-750.

Orbegozo J., M. Abanto, R. García, P. Ramírez. 2008. Identificación molecular de *Pichia guilliermondii* aislada de aguas ácidas de minas en el Perú y su resistencia a metales pesados. Revista peruana de biología 15(1): 91-96.

Olasupo, N., M. Scott-Emuakpor y R. Ogunshola. 1993. Resistance to heavy metal by some Nigerian yeast strains. Folia Microbiologica Journal 38(4): 285-287.

Palacios, E., L. Villalobos. 2007. Biosorción de metales pesados en solución acuosa mediante biomasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis para obtener el

título de Licenciatura en Ciencias Farmacéuticas. Universidad de las Américas Puebla.

Petterson R. & B. Sandstrom. 1995. Risk evaluation of essential trace elements – Essential versus toxic levels of intake. Copenhagen Nordic Council of Ministers 18.

Programa ambiental regional para Centroamérica. 2004. Reporte nacional de manejo de residuos en Guatemala.

www.ccad.ws/proarca/p_proarca/.../METALES_NO_FERROSOS_GUA.pdf

Ramesh S., R. Gandhimathi, N. Badabhagni and P. Nidheesh. 2011. Removal of Cd (II) from aqueous solution by adsorption onto coir pith, an agricultural solid waste: Batch experimental study. Environmental Engineering and Management Journal 10(11): 1667-1673.

Rehman A., H. Farooq and A. Shakoori. 2007. Copper Tolerant Yeast, *Candida tropicalis*, Isolated from Industrial Effluents: its Potential use in Wastewater Treatment. Pakistan Journal of Zoology 39(6): 405-412.

Rigola M. 1990. Tratamiento de aguas industriales: aguas de proceso y residuales, Boixareu Editores: Barcelona.

Rodríguez H. 2001. Estudio de la contaminación por metales pesados en la Cuenca de Llobregat. Tesis Doctoral. Universitat Politècnica de Catalunya, Barcelona.

Rodríguez M, R. Miranda, R. Olivas y C. Sosa. 2008. Efectos de las Condiciones de Operación Sobre la Biosorción de Pb^{2+} , Cd^{2+} y Cr^{3+} en Solución por *Saccharomyces cerevisiae* Residual. Universidad Autónoma de Nuevo León. Información Tecnológica 19(6): 47-55.

Saitou N. y M. Nei, 1987. The neighbor-Joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution 4: 406-425.

Sans R. y Ribas J. 1989. Ingeniería Ambiental: Contaminación y tratamientos, Productiva: Barcelona pp101-104.

Schiewer, S. y B. Volesky. 1997a. Ionic Strength and Electrostatic Effects in Biosorption of Protons. Environmental Science and Technology 31(7): 1863-1871.

Schiewer, S. y B. Volesky. 1997b. Ionic Strength and Electrostatic Effects in Biosorption of Divalent Metal Ions and Protons. Environmental Science and Technology 31(9): 2478-2485.

Singh H. 2006. Mycoremediation. Fungal Biorremediation. Ed. Jhon Wiley & Sons Inc. New Jersey. Capítulo 11 pp 505.

Soto C., S. Gutierrez, A. Rey y E. Gonzales. 2010. Biotransformación de metales pesados presentes en lodos ribereños de los ríos de Bogotá y Tunjuelo. Revista NOVA - Publicación Científica en ciencias biomédicas 8(14):195-205.

Stoll, A. 1996. Bioaccumulation of heavy metal by the yeast *S. cerevisiae* and the bioremediation of industrial waste water. Tesis para optar al título de Doctor en Bioquímica y Microbiología. Facultad de Ciencia. Universidad Rhodes. Sudáfrica.

Tálos, K., C. Páger, S. Tonk, C. Majdik, B. Kocsis, F. Kilár, T. Pernyeszi. 2009. Cadmium biosorption on native *Saccharomyces cerevisiae* cells in aqueous suspension. Acta Universitatis Sapientiae Agriculture and Environment 1(1):20-30.

Tenorio, G. 2006. Caracterización de la biosorción de cromo con huesos de aceituna. Tesis doctoral. Universidad de Granada. Departamento de Ingeniería Química.

Vargas-García, M., F. Suárez-Estrella, M. López, G. Guisado y J. Moreno. 2010. Biorremediation of heavy metals with microbial isolates. Universidad de Almería. España.

Volesky, B. 2007. Biosorption and me. Water Research 41(18): 4017-4029.

Wang, J. & C. Chen. 2009. Biosorbents for heavy metals removal and their future. Biotechnology Advances 27(2):195-226.

Weissman, Z., I. Berdicevsky, B. Cavari y D. Kornitzer. 2000. The high copper tolerance of *Candida albicans* is mediated by a P-type ATPase. Department of Molecular Microbiology. The Bruce Rappaport Faculty of Medicine, Technion-Israel Institute of Technology and National Institute of Oceanography. Israel.

WHO. 1998. Cooper. Environmental health criteria, Geneva: World Health Organization.

Wright D. y P. Welbourn. 2002. Environmental Toxicology. Cambridge University Press, Cambridge, U.K.

Yilmazer P. & N. Saracoglu. 2009. Bioaccumulation and biosorption of copper (II) and chromium (III) from aqueous solutions by *Pichia stipitis* yeast. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 84(4): 604 – 610.

Zambrano J. 2011. Tratamiento de efluentes generados por biolixiviación en la extracción de metales preciosos mediante recuperación selectiva de hierro, cobre y cinc. Tesis de grado presentada como requisito para la obtención del título de Ingeniera Ambiental. Universidad San Francisco de Quito.

Zhang I., Y. Dai, B. Liu, F. Ma, R. Zheng y L. Dong. 2011. Biosorption of lead from aqueous solution by using chemically treated *Saccharomyces cerevisiae*. Environmental Engineering and Management Journal 10(6): 729-732.

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jobm.200510569/abstract;jsessionid=BB98B05B6586BADE52BC0958C3120C4B.f01t02?systemMessage=Wiley+Online+Library+will+be+disrupted+on+21st+March+from+10%3A30+GMT+up+to+six+hours+and+from+05%3A30+EDT+up+to+six+hours+for+essential+maintenance.++Apologies+for+the+inconvenience>. Copper tolerant yeast isolated from polluted area of Argentina.

12. ANEXO

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Candida intermedia gene for 26S rRNA, partial sequence, strain: SM 54	902	902	100%	0.0	99%	AB281307.1
<input type="checkbox"/>	Candida intermedia gene for 26S rRNA, partial sequence, strain: EB9	900	900	99%	0.0	99%	AC430392.1
<input type="checkbox"/>	Candida intermedia 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	900	900	99%	0.0	99%	U44009.1
<input type="checkbox"/>	Candida intermedia strain FL023 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	946	946	100%	0.0	99%	KJ192011.1
<input type="checkbox"/>	Candida pseudointermedia gene for 26S rRNA, partial sequence, strain: SM 22	946	946	100%	0.0	94%	AF1201311.1
<input type="checkbox"/>	Candida intermedia gene for 26S rRNA, partial sequence, strain: SM 48	946	946	100%	0.0	99%	AB281306.1
<input type="checkbox"/>	Candida pseudointermedia 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	944	944	99%	0.0	99%	U44016.1
<input type="checkbox"/>	Uncultured fungus clone 2401MH6 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	942	942	100%	0.0	99%	KJ267414.1
<input type="checkbox"/>	Candida intermedia strain YA02a 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	942	942	100%	0.0	99%	EF629546.1
<input type="checkbox"/>	Candida intermedia strain YA01a 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	942	942	100%	0.0	99%	EF362751.1
<input type="checkbox"/>	Candida pseudointermedia strain JNXL-2 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	941	941	99%	0.0	99%	JX049426.1
<input type="checkbox"/>	Candida intermedia partial 26S rRNA gene, strain CBS 7163T	941	941	99%	0.0	99%	AJ608588.1
<input type="checkbox"/>	Candida intermedia isolate C 1/23 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	937	937	100%	0.0	99%	KM246051.1

Figura 24. BLASTn de la cepa 3JS 500 3LK.

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Candida tropicalis strain Z067B0VS 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	1046	1046	100%	0.0	100%	KP064123.1
<input type="checkbox"/>	Candida tropicalis strain LYE 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	1046	1046	100%	0.0	100%	KF359928.1
<input type="checkbox"/>	Candida tropicalis strain ATCC 750 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	1046	1046	100%	0.0	100%	KJ651191.1
<input type="checkbox"/>	Candida tropicalis strain KULYH3-4 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	1046	1046	100%	0.0	100%	KJ606734.1
<input type="checkbox"/>	Candida tropicalis strain SSm-29 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2	1046	1046	100%	0.0	100%	KF291607.1
<input type="checkbox"/>	Candida tropicalis gene for large subunit ribosomal RNA, partial sequence, strain: UIMKH1636	1046	1046	100%	0.0	100%	AG772433.1
<input type="checkbox"/>	Candida tropicalis strain L1MY1 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	1046	1046	100%	0.0	100%	JX532150.1
<input type="checkbox"/>	Candida tropicalis strain ATY3 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	1046	1046	100%	0.0	100%	JX532154.1
<input type="checkbox"/>	Candida tropicalis gene for 26S ribosomal RNA, partial sequence, strain: BUF12-1	1046	1046	100%	0.0	100%	AB741059.1
<input type="checkbox"/>	Candida tropicalis gene for 26S ribosomal RNA, partial sequence, strain: BUF9-5	1046	1046	100%	0.0	100%	AB741057.1
<input type="checkbox"/>	Candida tropicalis strain UIMC041851 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	1046	1046	100%	0.0	100%	JN031574.1
<input type="checkbox"/>	Candida tropicalis isolate JKS5 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	1046	1046	100%	0.0	100%	JQ636732.1
<input type="checkbox"/>	Candida tropicalis gene for 26S ribosomal RNA, partial sequence, strain: C1	1046	1046	100%	0.0	100%	AG749443.1

Figura 25. BLASTn de la cepa 3TA 500 1K.